

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

D^r CALMETTE, sous-directeur de l'Institut Pasteur
D^r L. MARTIN, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r ROUX, directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r VAILLARD, membre de l'Académie de Médecine.

QR
1
A475
V.39
1925
PER

TOME TRENTE-NEUVIÈME

1925

AVEC 18 PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

Digitized by the Internet Archive
in 2024

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

SUR L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE ET SUR LES ANATOXINES EN GÉNÉRAL

par G. RAMON.

Nous avons fait connaître qu'il est possible de transformer facilement une toxine diphtérique, même très nocive, en un produit nouveau que nous avons désigné sous le nom d'anatoxine et qui, dépourvu de toxicité (1), possède cependant toutes les qualités antigènes de la toxine d'où il est issu (2). *In vitro*, en effet, l'anatoxine peut flocculer en présence d'antitoxine, dans les mêmes conditions que la toxine, ce qui peut permettre, ainsi que nous l'avons déjà indiqué et ainsi que nous l'établirons plus loin, de se rendre compte de sa valeur antigène, au moyen de la réaction de flocculation. *In vivo*, comme nos essais préliminaires, chez le cobaye en particulier, l'ont montré, elle

(1) Dès le début de ce mémoire, nous tenons à insister sur ce point sur lequel nous reviendrons plus loin, c'est que l'anatoxine, pour mériter ce nom, doit être atoxique, sans L O, ni L +.

(2) Rappelons que l'anatoxine diphtérique peut être facilement obtenue en traitant la toxine par l'aldéhyde formique (3 à 4 p. 1.000) en présence de la chaleur. Mais si le formol est un bon agent de transformation de la toxine en anatoxine, il n'est pas le seul. Des recherches actuellement en cours, en collaboration avec M. Berthelot, nous ont déjà permis de déceler plusieurs agents chimiques (en particulier d'autres aldéhydes) jouissant de la même propriété que l'aldéhyde formique. Nous avons d'ailleurs indiqué déjà, qu'avec la chaleur ménagée, la liqueur de Gram, on peut aussi préparer des anatoxines, inférieures il est vrai dans leurs résultats à celles obtenues par l'action combinée de la chaleur et du formol.

est capable d'engendrer l'immunité avec une facilité et une rapidité plus grandes que la toxine elle-même, puisque l'obstacle qui constituait dans cette dernière la nocivité est levé. Aussi, ainsi que nous l'écrivions en conclusion de notre précédent mémoire, l'anatoxine doit-elle trouver son emploi dans l'immunisation et l'hyperimmunisation des animaux : elle est, de plus, tout indiquée pour la vaccination antidiphtérique de l'homme. Ce sont les premiers résultats de ces utilisations diverses, avec les enseignements qu'ils comportent, que nous donnerons tout d'abord ici.

L'anatomie diphtérique dans l'immunisation et l'hyperimmunisation des animaux.

Nous avons poursuivi, chez le cheval, l'immunisation que nous avons commencée et qui nous avait déjà donné quelques précieuses indications, nous proposant de rechercher si l'anatoxine peut se substituer à la toxine, et dans quelles conditions, pour la préparation du sérum antidiphtérique.

A l'heure actuelle, nous avons pu immuniser et hyperimmuniser par l'anatoxine plus de 150 chevaux. En utilisant la méthode de floculation (1) pour doser leur sérum, nous avons

(1) Depuis trois ans, nous pratiquons les dosages du sérum antidiphtérique, à raison d'une cinquantaine au minimum par semaine, par la méthode de floculation. Lorsqu'il s'agit de sérums provenant de la première saignée pratiquée après la période d'hyperimmunisation des chevaux, nous employons parallèlement la floculation et la méthode *in vivo*. La concordance entre les deux méthodes nous apparaît toujours aussi bonne. Les quelques discordances que nous avons pu constater au cours d'un nombre considérable — plus d'un millier — d'essais comparatifs doivent être surtout considérées comme des défaillances de la méthode *in vivo* (différences individuelles entre les cobayes, variations de poids, etc..., influence de la nourriture, des saisons, etc...); la floculation apporte ici en régularité et en précision toute la supériorité d'une réaction physico-chimique sur un procédé biologique, sans oublier d'un autre côté et la facilité de sa mise en œuvre et l'économie qu'elle procure.

Les travaux confirmatifs d'un certain nombre d'auteurs, en particulier Schmidt, Renaux, Weinberg, Schotz, Glenny et Okell, etc..., qui, pour plusieurs d'entre eux, emploient la méthode sur une grande échelle, constituent la meilleure preuve de sa valeur. Aussi, nous nous étonnons que Sordelli et Serpa dans une note récente, dans laquelle ils citent seulement une discordance de 45 p. 100 (discutable d'ailleurs) entre l'*in vivo* et l'*in vitro*, concluent à une approximation pas très grande de la floculation. Nous nous demandons, il est vrai, à la lecture de cette note, s'ils ont bien appliqué le principe de la méthode.

pu suivre pour ainsi dire jour par jour la production de l'antitoxine diphtérique, ce qui nous a permis, en premier lieu, de nous renseigner sur la vitesse d'apparition de cette antitoxine (1). Nous avons fait connaître, antérieurement, que neuf jours après une première injection de 1 cent. cube d'anatoxine, faite sous la peau d'un certain nombre de chevaux, le sérum de ces animaux était déjà riche en antitoxine, puisqu'il pouvait contenir jusqu'à 20 et même 30 unités antitoxiques au centimètre cube. Depuis, nous avons rencontré des chevaux qui, dix jours après avoir reçu comme première injection une dose d'anatoxine plus forte, 25 cent. cubes, fournissaient des sérums titrant jusqu'à 100, quelquefois 200, et même exceptionnellement, il est vrai, 300 unités au centimètre cube. En réalité, l'antitoxine apparaît bien avant ce délai de neuf à dix jours. Nous avons, en effet, constaté sa présence à raison de 5 à 10 unités et plus au centimètre cube dans le sérum de très nombreux chevaux, cinq à six jours après la première injection d'anatoxine, qui était de 1, ou 10, ou 25, ou encore 50 cent. cubes, suivant les séries d'animaux. Dans nombre de cas, nous avons décelé plusieurs unités au centimètre cube trois jours et même parfois quarante-huit heures après cette injection unique. La présence d'une telle quantité d'antitoxine, à ce moment, indique d'ailleurs que l'on peut mettre en évidence encore plus tôt des traces très appréciables (par la méthode de Römer, par exemple) d'antitoxine. Mais, à ce propos, il ne faut pas oublier, ainsi que Roux et Martin l'avaient déjà constaté dès le début de la sérothérapie, que le sérum de certains chevaux neufs peut renfermer de minimes quantités d'antitoxine.

Après la première injection, nous avons suivi, quant à la

(1) Jusqu'ici l'étude de la vitesse d'apparition de l'antitoxine était très difficile sinon impossible à entreprendre dans de bonnes conditions. En effet, la dose de toxine diphtérique que l'on peut injecter d'emblée à un animal neuf, même du poids d'un cheval, étant très faible, son pouvoir antigène est très réduit et la quantité d'antitoxine qui apparaît par la suite est trop minime pour être facilement appréciée. De plus, et bien qu'à divers points de vue la méthode intradermique de Römer (ou ses dérivés) ait marqué un progrès sensible, les techniques de dosage *in vivo* de l'antitoxine, celle d'Ehrlich, en particulier, sont très lentes, bien compliquées et trop coûteuses pour pouvoir être utilisées à répétition sur une grande échelle. D'une part, l'emploi de l'anatoxine diphtérique douée d'un pouvoir antigène élevé, dénuée de toute toxicité et pouvant, par conséquent, être injectée d'emblée à haute dose, d'autre part, l'utilisation de la réaction de flocculation, donnent toutes facilités pour des recherches du genre de celles que nous envisageons ici.

progression des doses d'anatoxine et au rythme des injections successives, des protocoles d'immunisation variés, entre autres celui-ci :

				CENTIMÈTRES CUBES
Première	injection d'anatoxine sous la peau.			5
Deuxième	—	—	—	10
Troisième	—	—	—	25
Quatrième	—	—	—	50
Cinquième	—	—	—	100
Sixième	—	—	—	150
Septième	—	—	—	200
Huitième	—	—	—	250
Neuvième	—	—	—	300

soit 1.090 cent. cubes d'anatoxine en 9 injections; ces injections étant faites deux fois par semaine : le lundi et le jeudi, et la première grande saignée (en dehors des saignées d'épreuve) effectuée trente-cinq jours environ après le début de l'immunisation. On peut aller plus vite et se borner à un nombre plus restreint d'injections. Par exemple :

				CENTIMÈTRES CUBES
Première	injection d'anatoxine sous la peau.			25
Deuxième	—	—	—	50
Troisième	—	—	—	100
Quatrième	—	—	—	200
Cinquième	—	—	—	300
Sixième	—	—	—	400

soit 1.075 cent. cubes d'anatoxine; la première saignée abondante était faite vingt-cinq jours seulement après le commencement de l'immunisation.

Au point de vue des quantités d'anatoxine à injecter, il n'y a pas d'intérêt, ainsi qu'on pourrait être tenté de le croire, à employer, surtout au début, de très grandes doses. La production d'antitoxine, en effet, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte au cours de nos essais, n'est pas directement proportionnelle à la quantité d'anatoxine injectée (1); par contre, elle est en rapport étroit avec sa qualité (2); aussi, nous

(1) Il semble, lorsqu'on injecte d'emblée une grosse dose, par exemple 100 c. c. ou plus, qu'une grande partie de cette anatoxine ne soit pas utilisée par l'organisme et la production n'est guère supérieure à celle qui fait suite à l'injection d'une dose beaucoup plus réduite.

(2) Elle dépend aussi, ne l'oublions pas, pour une très large part, de l'individualité de l'animal; nous en reparlerons plus loin.

avons cherché à n'utiliser que des anatoxines de « qualité », aidé en cela par la réaction de floculation qui nous permettait de choisir des anatoxines ayant un pouvoir floculant élevé, c'est-à-dire capables de floculer en présence de quantités maxima d'antitoxine; nous aurons l'occasion de revenir sur ce point.

Sous l'influence des injections successives d'anatoxine, le sérum des animaux s'enrichit rapidement en antitoxine. Chez les nombreux chevaux dont nous avons poursuivi l'hyperimmunisation, la teneur des sérums en antitoxine à la fin de cette hyperimmunisation a varié suivant les séries d'animaux qui étaient vaccinés selon des protocoles différents et avec des anatoxines de valeur antigène variable, mais bonne en général. Nous donnerons seulement ici les résultats récemment acquis pour une série de 50 chevaux qui ont été immunisés dans les mêmes conditions avec la même anatoxine. A la fin de la période d'hyperimmunisation, les dosages des sérums effectués à la fois par la floculation et par la méthode *in vivo* ont fourni les chiffres suivants :

Sérums à 1.000 unités et au-dessus	6 soit 12 p. 100
— à 800 et 900 unités	11 — 22 p. 100
— à 600 et 700 —	9 — 18 p. 100
— à 400 et 500 —	9 — 18 p. 100
— à 200 et 300 —	10 — 20 p. 100
Au-dessous de 200 unités.	5 — 10 p. 100

ce qui correspond à une moyenne générale de plus de 500 unités.

Or, nous n'avons jamais obtenu de moyenne supérieure à celle-ci, en utilisant les anciennes méthodes de préparation du sérum antidiphtérique qui comportent un nombre plus grand d'injections, un temps d'immunisation plus long et une quantité, en général, beaucoup plus considérable de toxine diphtérique non transformée (1). Ajoutons, d'ailleurs, que l'utilisation

(1) Cent chevaux, dont l'immunisation par l'anatoxine (effectuée, en partie, par les soins de MM. Loiseau et Frasey) vient d'être terminée, ont donné, comme teneur moyenne de leur sérum en antitoxine : 525 unités. Par comparaison, la moyenne obtenue les années précédentes chez cent chevaux placés dans les mêmes conditions mais immunisés avec la toxine (par les méthodes habituelles) n'a pas dépassé 400 unités. On voit combien l'absence de toxicité (dans l'anatoxine) favorise la production d'antitoxine.

de la toxine non modifiée et très nocive n'est pas sans risques, sinon pour la vie même des chevaux producteurs de sérum antidiphthérique, du moins pour leur état de santé qui laisse souvent plus ou moins à désirer. Au contraire, ces animaux supportent parfaitement bien les injections d'anatoxine: on note parfois, chez quelques-uns d'entre eux, un peu de fièvre et d'inappétence le jour de l'injection, ainsi qu'un œdème au point d'inoculation qui se résorbe rapidement, laissant seulement dans certains cas (lors d'injections massives) un engorgement décline un peu plus lent à disparaître (1).

Ainsi, l'anatoxine diphthérique peut déterminer rapidement, par hyperimmunisation du cheval, la production d'antitoxine de haute valeur; elle peut se substituer avec avantages — économie de temps et de matériel (antigène), absence de risques pour la vie et la santé des animaux, etc. — à la toxine pour la préparation du sérum antidiphthérique.

HYPERIMMUNISATION DU CHEVAL AVEC UNE « ANATOXINE TOTALE ».

Il n'est pas jusqu'aux cultures entières elles-mêmes de bacilles de Löffler qui ne puissent être transformées en ce que nous avons appelé « anatoxines totales ». Par exemple, au lieu de filtrer au dixième jour une culture en bouillon du bacille diphthérique, ajoutons-lui du formol, laissons cette culture ainsi formolée à l'étuve pendant un mois environ (2). Au bout de ce laps de temps, la culture entière, bacilles et toxine, est complètement « désintoxiquée » (3); elle peut alors être injectée impunément au cheval, même à doses massives (plusieurs cen-

(1) Ces réactions (comme celles que l'on observe, très rarement d'ailleurs, chez l'homme adulte) correspondent à une hypersensibilité spécifique, aux protéines qui entrent dans la constitution de la toxine diphthérique (et de l'anatoxine) ou qui lui servent de support. Cette hypersensibilité est très vraisemblablement acquise à la suite d'un contact, même sans infection visible, avec le bacille de Löffler, le Schick négatif que présentent presque toujours les chevaux hypersensibles ne pouvant guère s'expliquer que de cette façon.

(2) Nous avons traité aussi par le même procédé ou un procédé analogue des cultures d'autres germes plus ou moins toxiques (b. pesteux, streptocoques, etc.). Il nous apparaît dès maintenant que ces cultures ainsi modifiées et d'une innocuité parfaite constituent de meilleurs antigènes que les mêmes cultures ayant subi par l'exemple l'action brutale de la chaleur.

(3) La préparation de cette « anatoxine générale » a été effectuée, à notre demande, dans le service des toxines (service de M. L. Martin).

taines de centimètres cubes). Le sérum des animaux ainsi traités possède-t-il en dehors de son pouvoir toxique d'autres qualités? C'est ce que des essais actuellement en cours, soit au laboratoire, soit en clinique, nous diront.

L'anatoxine diphtérique et la vaccination antidiphtérique de l'homme.

Dès que nous eûmes constaté par l'expérimentation chez les animaux, d'une part, les propriétés immunisantes de l'anatoxine diphtérique, et, d'autre part, sa parfaite innocuité — vérifiée d'ailleurs sur nous-même — nous avons proposé cette anatoxine pour la vaccination antidiphtérique de l'homme (1).

A ce jour, de nombreux essais d'immunisation préventive ont déjà été effectués (2), soit chez l'enfant, soit chez l'adulte (L. Martin, Darré, Loiseau et Laffaille, Roubinovitch, Zoeller, Lereboullet et Joannon, Henseval et Nelis). Des résultats de tous ces essais, dont pour le détail nous renvoyons aux publications des auteurs, on peut dès maintenant tirer la conclusion générale suivante : *c'est qu'avec deux injections (sous-cutanées) d'anatoxine, la première de 0 c. c. 5, la seconde de 1 cent. cube, faites à une vingtaine de jours d'intervalle (3), on peut en cinq à six semaines chez 90-95 p. 100 des enfants, en deux mois chez 98-100 p. 100, obtenir le degré d'immunité, indiqué par la transformation en réactions de Schick négatives, de réactions qui étaient positives immédiatement après la première injection*

(1) Nous ne ferons pas ici l'historique des tentatives de vaccination antidiphtérique faites avant et surtout depuis que Behring eut lancé son vaccin T. A. Il faudrait un chapitre tout spécial. Nous dirons seulement que, soit la préparation presque toujours délicate de ces vaccins, soit dans certains cas leur toxicité plus ou moins grande, soit encore la difficulté et même l'impossibilité de contrôler expérimentalement leurs qualités immunisantes, etc.; soit, enfin, la lenteur de l'immunité qu'ils sont plus ou moins capables de provoquer et l'incertitude des résultats obtenus, enlèvent beaucoup à leur valeur pratique.

(2) D'autres plus nombreux encore sont en cours.

(3) Comme l'expérience chez le cobaye nous l'avait déjà montré, l'immunité ne s'établit guère mieux après deux injections à huit jours d'intervalle qu'après une seule injection; l'immunité est moins bonne avec quinze jours d'intervalle seulement entre les deux injections qu'avec trois semaines. En outre, deux injections de 0 c. c. 5, par exemple, et espacées d'une vingtaine de jours, valent incomparablement mieux, au point de vue immunité, qu'une seule injection, serait-elle de 2 cent. cubes.

d'anatoxine; ce qui ne signifie pas que la plupart des vaccinés (ayant reçu les deux injections ou même une seule) ne possèdent pas déjà, bien avant ce délai de cinq semaines, une immunité suffisante pour résister à l'infection diphtérique ou ne faire qu'une diphtérie bénigne [cas signalés par Zoeller] (1).

Chez les adolescents et chez les adultes, que l'on sait beaucoup plus réfractaires que l'enfant à l'immunisation antidiphtérique, il a pu arriver, dans des essais rapportés par certains des auteurs cités plus haut, qu'au bout de deux mois (après la première injection) quelques Schick aient été encore positifs, faiblement positifs d'ailleurs; une troisième injection d'anatoxine les a rapidement transformés en Schick négatifs; mais, nous sommes persuadé qu'il n'y a là qu'un léger retard portant beaucoup plus sur le degré d'immunité que sur l'immunité indispensable pour résister à l'infection et qu'il n'y aura guère lieu dans la pratique de recourir à cette troisième injection.

Si chez les adultes et les grands enfants, et aussi et surtout chez les individus se trouvant dans un état un peu spécial (convalescents récents de diphtérie, porteurs de germes, etc.), on a signalé à la suite de l'injection d'anatoxine quelques réactions (2) d'ailleurs modérées (œdème, empâtement local, fièvre), ces réactions sont très exceptionnelles, pour ainsi dire jamais constatées chez le jeune enfant.

Si l'on met à part certaines circonstances particulières qui peuvent réclamer l'immunisation diphtérique à différents moments de la vie : immunisation du personnel hospitalier, de collectivités menacées par une épidémie (écoles, lycées, garnisons, etc.), il semble que l'âge le plus favorable pour pratiquer la vaccination par l'anatoxine soit compris entre douze à quinze mois et cinq à six ans. Les enfants de cet âge, en effet, sont aussi réceptifs à l'immunisation par l'anatoxine qu'ils sont sensibles à la maladie; de plus, comme nous venons de

(1) Ajoutons que Zoeller, en injectant dans la peau 0 c. c. 2 d'une solution d'anatoxine à 1 p. 1.000, peut déceler au bout de vingt-quatre heures, chez certains sujets, ce qu'il a appelé une anatoxi-réaction. D'après lui, cette anatoxi-réaction décèle un état particulier qui, sans être l'immunité vraie, représente un stade plus ou moins avancé vers l'immunité.

(2) Ces réactions sont de même ordre que celles signalées depuis longtemps comme pouvant se produire avec la toxine chauffée ou les mélanges toxine-antitoxine sous ou surneutralisés; nous en avons rappelé l'origine à propos de réactions semblables observées chez les animaux.

l'indiquer, ils ne présentent vis-à-vis de l'anatoxine diphtérique que des réactions exceptionnelles et minimales (1).

Quelle sera la durée et quelle est, en somme, la valeur de l'immunité ainsi conférée par l'anatoxine diphtérique? A l'heure actuelle, il est très généralement admis que l'immunité acquise soit spontanément, soit artificiellement (par immunisation active), et qui se traduit par la réaction de Schick négative, est une immunité solide et pouvant durer, si l'on s'en réfère à l'expérience déjà grande des auteurs américains (Park et Zingher), toute la vie. Il n'y a pas de raison pour qu'il en soit autrement de l'immunité acquise grâce à l'anatoxine. Sans doute, après avoir augmenté plus ou moins longtemps encore après la dernière injection d'anatoxine, l'immunité ou, si l'on préfère, la quantité d'antitoxine que recèle l'organisme diminuera par la suite; mais il suffira probablement, à l'exemple de ce qui se passe dans l'immunisation spontanée (Lereboullet et Joannon, Dudley), de quelques contacts bien minimales (sans infection cliniquement décelable, ou, en tout cas, à peine marquée) avec le bacille de Löffler pour que cette immunité prenne un nouvel essor.

Il serait intéressant, d'ailleurs, à tous ces points de vue, de multiplier les essais dans le genre de celui que vient d'entreprendre Zøeller et dont il a fait connaître récemment les premiers résultats. Au cours d'une épidémie de diphtérie (chez des adultes), il a vacciné avec l'anatoxine un certain nombre de réceptifs. Deux mois et demi après le début des injections préventives d'anatoxine sur 102 réceptifs ayant reçu 2 injections ($1/2$ et 1 cent. cube à quinze jours d'intervalle) aucun cas de diphtérie n'a été constaté; sur 41 sujets qui n'avaient reçu qu'une injection, 1 cas de diphtérie a été noté très bénin (simple angine rouge). Pendant ce temps, on a enregistré 48 cas de diphtérie sur 1.400 réceptifs non vaccinés, soit près de 3 p. 100.

Ainsi, si, d'une part, on veut bien appliquer d'une façon systématique la méthode de vaccination que nous venons d'envisager et qui est d'une mise en œuvre facile; si, d'autre part,

(1) Grâce à l'innocuité de l'anatoxine et à l'absence de réaction chez l'enfant il nous semble même possible (la période d'essais passée) de supprimer l'épreuve préalable de Schick et de vacciner tous les enfants.

l'immunité engendrée rapidement par l'anatoxine se maintient, ainsi qu'on est en droit de l'espérer, dans le temps, la prophylaxie de la diphtérie aura fait un très grand pas (1).

REMARQUE. — L'ANATOXINE DANS LE TRAITEMENT CURATIF
DE LA DIPHTÉRIE.

L'anatoxine doit-elle être exclusivement réservée à la prévention de la diphtérie, et ne peut-elle trouver place dans le traitement curatif de la diphtérie? Quelques essais ont déjà été tentés (d'autres sont en cours), soit, par exemple, pour hâter la disparition des germes chez les porteurs, soit pour mettre le malade à l'abri des complications tardives de la diphtérie, et cela par l'action de l'anatoxine seule ou bien par l'action simultanée de l'antitoxine et de l'anatoxine, ou bien encore par l'action de mélanges d'antitoxine et d'anatoxine (Renault et Lévy).

Les propriétés de l'anatoxine diphtérique
considérées au point de vue de ses applications.

L'anatoxine diphtérique étant, comme nous venons de le voir, susceptible d'un certain nombre d'applications soit dans le domaine expérimental, soit dans le domaine pratique, il importe, en premier lieu, de pouvoir effectuer un contrôle, une mesure de ces propriétés essentielles : l'innocuité et le pouvoir antigène.

L'INNOCUITÉ DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE ET SON CONTRÔLE.

Le premier caractère de l'anatoxine, qui la distingue des toxines simplement atténuées, c'est l'atotoxicité. Pour être, selon la définition que nous en avons donnée dès le début, une

(1) Nous signalerons ici que Dujardin-Beaumetz et Malherbe ayant constaté l'étroite parenté du bacille de Belfanti (qu'ils rencontrent toujours dans l'ozène) et du bacille de Löffler ont eu l'idée d'injecter de l'anatoxine à des sujets atteints d'ozène; ils ont, disent-ils, obtenu les résultats les plus encourageants.

« anatoxine », le produit dérivé de la toxine doit être, avant tout, dépourvu de toxicité. Afin de nous assurer de cette innocuité, nous injectons sous la peau de plusieurs cobayes, pesant 280 à 300 grammes, 6 cent. cubes du produit à examiner. *Ce produit n'est considéré comme une anatoxine utilisable en pratique que si, à la dose envisagée, il ne provoque chez l'animal d'expérience aucune manifestation locale ou générale, précoce ou tardive d'intoxication diphtérique.*

LE POUVOIR ANTIGÈNE ET SA MESURE.

Une anatoxine, en dehors de son innocuité, doit être douée de propriétés immunisantes; il est donc nécessaire de pouvoir être renseigné sur ces propriétés et, pour cela, il est indispensable d'avoir à sa disposition un moyen pratique de doser le pouvoir antigène de l'anatoxine. Jusqu'ici, une toxine diphtérique était évaluée, même au point de vue immunité (ce qui était d'ailleurs une erreur, comme nous l'avons indiqué dans notre précédent mémoire), en fonction de sa toxicité, c'est-à-dire en nombre de doses mortelles, ou encore, depuis Ehrlich, en LO, en L+. Vouloir évaluer de même une anatoxine serait doublement impossible et absurde, puisque, le propre de l'anatoxine, c'est d'être immunisante sans être toxique. On ne peut songer non plus à se rendre compte *in vivo*, chez l'animal d'expérience, du pouvoir immunisant de chaque échantillon d'anatoxine; ce serait matériellement et pratiquement impossible, étant donnés la grande quantité d'animaux et le temps très long exigés par de semblables essais.

Nos premières expériences comparatives de floculation *in vitro* et d'immunisation *in vivo*, chez le cobaye principalement, nous avaient déjà montré antérieurement que le pouvoir floculant et le pouvoir immunisant de l'anatoxine sont en relation très étroite. Depuis, nous avons toujours, et systématiquement, recherché la valeur floculante des échantillons d'anatoxine utilisés dans les multiples essais d'immunisation et d'hyperimmunisation que nous avons entrepris, soit chez le cobaye, soit chez le cheval, et dans les très nombreuses vaccinations effectuées à ce jour chez l'homme. L'expérience déjà grande, pour ne pas dire considérable, que nous avons ainsi acquise par la

comparaison des résultats de la floculation et de l'immunisation nous permet de conclure aujourd'hui que la réaction de floculation peut nous fixer facilement et aussi exactement que possible (1) quant à la valeur antigène de l'anatoxine. Mais comment exprimer et chiffrer cette valeur? En unités antigéniques ou anatoxiques, représentées par le nombre d'unités antitoxiques capables de saturer *in vitro* 1 cent. cube d'anatoxine, c'est-à-dire capables de faire apparaître dans ce centimètre cube la floculation initiale.

On peut, pour la pratique du dosage de l'anatoxine, adopter la technique suivante : disposons dans un porte-tube un certain nombre de petits tubes à hémolyse contenant chacun 1 cent. cube d'anatoxine à doser (nous préférons pour notre commodité employer 2 ou 4 cent. cubes). Ajoutons dans ces tubes (sous forme de dilutions d'un sérum étalon) un nombre d'unités antitoxiques, progressivement décroissant : 15-12-11-

(1) En réalité, la réaction de floculation ne nous donne pas (et aucune méthode *in vitro* et *in vivo* ne peut nous donner) la valeur immunisante absolue de l'anatoxine, mais seulement la valeur relative. Pourquoi cette « relativité »? Parce que, lorsqu'il s'agit de production d'anticorps par un antigène, quel qu'il soit, il faut toujours tenir compte des différences individuelles très grandes, souvent très considérables, que l'on rencontre chez les organismes vivants. En chimie, une même dose de réactif en présence d'un autre réactif produit toujours la même réaction qualitative et quantitative. En biologie, et particulièrement au point de vue qui nous intéresse, c'est-à-dire dans l'immunité active (des considérations analogues pourraient être développées pour l'immunité passive), une même dose de réactif — ici l'antigène — engendre une production d'un anticorps sans doute très rigoureusement spécifique — la spécificité constitue la caractéristique de l'immunité — mais cette production n'est jamais exactement quantitative. C'est ainsi que dans le tableau que nous avons donné des résultats acquis au cours de l'immunisation d'une série de cinquante chevaux, dans les mêmes conditions et avec la même anatoxine, nous trouvons, pour le sérum de ces animaux, des teneurs en antitoxine les plus variables depuis 1.000 unités et au-dessus jusqu'à 200 unités et au-dessous (à peine 100 pour deux chevaux).

C'est ainsi encore que dix jours après avoir injecté à six chevaux, les nos 56, 57, 58, 59, 60 et 61, la même dose, 25 cent. cubes, de la même anatoxine, nous avons obtenu comme titre respectif de leurs sérums : 15, 85, 65, 275, 50 et 200 unités. Or, si nous avions injecté à ces six animaux des échantillons différents d'anatoxine diphtérique, par exemple aux trois premiers une anatoxine A, aux trois derniers une anatoxine B, nous aurions été tenté d'attribuer à l'anatoxine A une valeur inférieure à celle de B, ce qui aurait pu être complètement inexact, et aussi en contradiction avec les données fournies par la floculation.

Il convient donc, lorsque l'on veut se faire une opinion certaine, d'opérer sur une échelle aussi large que possible afin de niveler en quelque sorte les différences individuelles par le nombre. C'est ce que nous avons fait depuis bientôt deux ans et c'est ce qui nous permet de formuler la conclusion ci-dessus.

10-9-8-7-6-5-4, etc...; agitions pour bien mélanger et plaçons les tubes pour aller plus vite soit à l'étuve à 38°, soit au bain-marie à 45°. Au bout d'un temps variable, nous constaterons, par exemple, que le tube contenant 10 unités antitoxiques floccule. Sans entrer ici dans des explications sur le principe de la flocculation, que nous avons déjà données plusieurs fois, nous dirons que l'échantillon d'anatoxine envisagé a une valeur de 10 unités anatoxiques ou antigéniques (1). Une anatoxine, dont la flocculation initiale serait provoquée par 5 unités antitoxiques, titrerait 5 unités antigéniques au centimètre cube. Et, si l'on a l'occasion d'expérimenter ces deux anatoxines au point de vue immunisation sur un très grand nombre de sujets, on se rendra compte que la moyenne générale des résultats obtenus avec l'anatoxine possédant 10 unités est supérieure à celle fournie par l'anatoxine dont la valeur antigène est égale à 5 unités seulement.

Il était indiqué de rechercher ce que deviennent les propriétés que nous venons d'envisager — pouvoir immunisant et innocuité — lorsque l'anatoxine est placée dans des conditions diverses ou soumises à des influences variées.

CONSERVATION DE L'ANATOXINE. — Si l'on place à la température de la glacière (3 ou 4° au-dessus de 0) une provision d'anatoxine et si, par la flocculation, on dose périodiquement son pouvoir immunisant, on constate qu'il reste constant pendant très longtemps. Après un an et plus, sa valeur en unités antigéniques n'a pas varié. Si l'anatoxine est gardée, non plus à la glacière, mais à la température du laboratoire (18 à 20°), il en est à peu près de même; à peine dans certains cas avons-nous noté un très léger affaiblissement (2). Cette stabilité du pouvoir antigène a pu d'ailleurs être vérifiée *in vivo*. En effet, en hyperimmunisant plusieurs séries de chevaux, nous avons pu

(1) Inutile d'ajouter que la toxine diphtérique peut au point de vue immunité être dosée de la même façon et sa valeur immunisante exprimée également en unités antigéniques; ce qui est beaucoup plus exact que de l'exprimer en doses mortelles ou en LO ou en L +; en effet sous des influences diverses, le pouvoir toxique varie à chaque instant, alors que les pouvoirs immunisant et flocculant restent constants et parallèles. A la suite de nos publications, Glenny, Barbara, Hopkins et Pope ont récemment proposé le symbole L f pour désigner la valeur flocculante de la toxine diphtérique.

(2) On remarque seulement un retard dans l'apparition de la flocculation lors du dosage de la valeur antigénique.

nous rendre compte que la production d'antitoxine était sensiblement équivalente, que l'anatoxine employée ait quelques jours ou plusieurs mois, ou même une année de préparation.

D'autre part, chez l'homme, Lereboullet et Joannon, Henseval et Nelis, avec une anatoxine que nous avions préparée depuis plus de six mois et qui avait été conservée soit à la glacière, soit au laboratoire, n'ont pas obtenu de résultats inférieurs à ceux de Darré, Loiseau et Laffaille, par exemple, qui ont utilisé la même anatoxine, mais quelques semaines seulement après sa préparation.

Nous avons contrôlé en même temps l'innocuité et, dans aucun cas, les anatoxines diphtériques placées pendant plus d'un an dans les conditions que nous venons d'envisager n'ont récupéré la moindre toxicité.

RÉSISTANCE AU CHAUFFAGE. TYNDALLISATION.

On sait qu'une toxine diphtérique, chauffée une heure à 65-70°, a perdu presque toute sa toxicité, qu'elle ne floccule plus en présence d'antitoxine, qu'elle ne la sature plus et qu'enfin, injectée à un organisme vivant, elle ne peut instaurer en lui qu'un « fondement d'immunité », selon l'expression d'Ehrlich, mais ne peut provoquer la formation d'une quantité abondante d'antitoxine (1).

Or, une anatoxine peut être chauffée à 65 et même 70°, elle est encore capable de saturer l'antitoxine comme on peut s'en rendre compte *in vivo* par l'expérimentation chez le cobaye, et ayant conservé sa valeur antigène, la flocculation l'indique, elle peut engendrer la production de l'antitoxine au même titre qu'une anatoxine non chauffée (2). C'est ainsi qu'après avoir

(1) Chez le cheval, les injections de très grosses doses d'une toxine chauffée une heure à 65-70° entraînent bien au début l'apparition de quelques unités dans le sérum, mais cette production est très limitée et n'augmente plus même en exagérant considérablement les doses.

(2) On peut chercher à se rendre compte de la marche du phénomène de transformation de la toxine en anatoxine et aussi de l'influence du chauffage au cours de cette transformation. Pour cela, prenons de la toxine diphtérique contenant au centicube 800 doses mortelles (pour le cobaye) et 40 unités antigéniques; après l'avoir additionnée de formol (3 cent. cubes 5 p. 1.000), plaçons-la à l'étuve à 38°-40°. Chaque jour prélevons deux échantillons : l'un servira aux dosages du pouvoir toxique (cobayes) et du pouvoir

constitué deux séries de chevaux, autant qu'il est possible équivalente au point de vue de l'aptitude des animaux à produire l'antitoxine (ce dont nous avons pu juger après une première injection d'anatoxine), nous avons injecté, les uns avec une anatoxine non chauffée, les autres avec la même anatoxine chauffée à 65-70° pendant une heure : la moyenne des unités antitoxiques obtenue était sensiblement la même dans les deux séries. Ce n'est qu'à partir de 72 ou 75° que l'anatoxine commence à être atteinte dans les propriétés que nous envisageons ici. Cette résistance au chauffage est importante pour la pratique puisqu'elle permet la tyndallisation de l'anatoxine.

Ainsi, d'une part la possibilité et la facilité de contrôle et de mesure des propriétés de l'anatoxine, d'autre part la conservation et la résistance de ces propriétés au chauffage, ajoutent encore à la valeur pratique de l'anatoxine diphtérique dans la production du sérum antidiphtérique et surtout dans le traitement préventif ou curatif de la diphtérie, valeur pratique que les résultats donnés dans ce mémoire permettent d'apprécier.

immunisant (floculation), l'autre sera utilisé pour la recherche de ce même pouvoir immunisant après chauffage d'une heure à 65°. On constate que le pouvoir toxique diminue de jour en jour : au bout de vingt-quatre heures, il est tombé de 800 à 50 doses mortelles, après trois jours à 10 doses mortelles, etc... après vingt jours, il faut 4 cent. cubes pour tuer un cobaye et après un mois le pouvoir toxique n'est plus appréciable ; à ce moment on se trouve en présence non plus de toxine, mais d'anatoxine. Durant cette période, la valeur antigène n'a pas changé ; au trentième jour, elle est toujours égale à 10 unités anatoxiques. Par contre, après chauffage, cette même valeur subit des fluctuations variées. Pendant les premiers jours, elle ne peut être mise en évidence ; l'échantillon prélevé se comporte, en somme, après chauffage comme un échantillon de toxine qui chauffée à 65° ne flocule plus. Le quatrième jour, le pouvoir floculant réapparaît, mais il indique 5 unités antigéniques seulement et la floculation est très retardée. Les jours suivants, l'échantillon chauffé augmente en unités antigéniques, et finalement au trentième jour, lorsque tout pouvoir toxique a disparu, lorsque la toxine est complètement transformée en anatoxine, cette anatoxine chauffée à 65° a la même valeur antigène que l'échantillon non chauffé, c'est-à-dire 10 unités anatoxiques. Ajoutons que nous nous sommes rendu compte que le formol, qui les premiers jours pourrait se trouver en liberté et agir lors du chauffage pour entraver la réaction de floculation ou la dérégler, n'était pas en jeu. De plus, en chauffant des mélanges en proportions variables d'anatoxine et de toxine, nous avons pu reconstituer les modalités de floculation de la toxine en voie de transformation, que nous venons de décrire.

L'ensemble bien caractéristique des propriétés de l'anatoxine, la façon spéciale de se comporter vis-à-vis de certaines influences comme le chauffage, tout ceci différencie très nettement l'anatoxine de la toxine elle-même, des toxines atténuées et dites « plus ou moins riches en toxoïdes », des mélanges toxine-antitoxine, etc., et justifie amplement le nom nouveau que nous lui avons donné.

Les autres anatoxines.

En dehors de la toxine diphtérique, d'autres antigènes plus ou moins toxiques peuvent-ils, eux aussi, être transformés, sans altération de leur pouvoir immunisant, en antigènes inoffensifs, comparables par leurs propriétés respectives à l'anatoxine diphtérique? Telle était la question qui venait naturellement à l'esprit et à la quelle il était tout indiqué de s'intéresser.

ANATOXINES CORRESPONDANT AUX TOXINES MICROBIENNES.

ANATOXINE TÉTANIQUE. — Dès le début de nos recherches sur la réaction de floculation, nous avons indiqué que toxine et antitoxine tétaniques se comportent dans cette réaction d'une façon analogue à la toxine et à l'antitoxine diphtériques. Nous signalions par la suite que la toxine tétanique était, elle aussi, susceptible de se transformer en anatoxine. Notre collègue Descombey, qui, sur nos indications, a entrepris des recherches détaillées sur ce sujet, a montré que ce que nous avons fait connaître quant à la préparation de l'anatoxine diphtérique et quant aux renseignements que peut donner la floculation sur le pouvoir antigène était également applicable à l'anatoxine tétanique.

Cette anatoxine inoffensive est douée des propriétés immunisantes les plus marquées. Elle peut servir dans les mêmes conditions que l'anatoxine diphtérique à l'hyperimmunisation des chevaux producteurs d'antitoxine tétanique (1).

En outre, les premières recherches expérimentales effectuées à ce jour laissent espérer que l'anatoxine tétanique pourra remplacer avantageusement en médecine vétérinaire le sérum antitétanique dans nombre de cas, par exemple lors des interventions chirurgicales, chez le cheval en particulier, ou bien pour protéger les nouveau-nés (poulains et agneaux) vis-à-vis du tétanos d'origine ombilicale, ou bien encore pour pratiquer sys-

(1) Rappelons que Lowenstein et ses collaborateurs avaient employé une toxine tétanique formolée pour remplacer, au début de l'immunisation du cheval producteur de sérum, la toxine iodée.

tématiquement la vaccination antitétanique dans les « régions à tétanos ». *On obtiendra ainsi par l'anatoxine tétanique une immunité active beaucoup plus solide et beaucoup plus durable (1) que l'immunité passive légère et passagère qui résulte d'une injection de sérum.*

Enfin, l'anatoxine tétanique, qui se montre également inoffensive vis-à-vis de l'homme (essais en cours), pourra être employée chez lui, tout au moins dans certains cas, pour la prévention du tétanos. Nous ne savons pas, à l'heure actuelle, si à l'injection de sérum antitétanique que l'on doit faire après toute blessure souillée on pourra substituer une injection d'anatoxine; en effet, chez l'homme la période d'incubation du tétanos est parfois très réduite et nous ne connaissons pas encore suffisamment la rapidité d'apparition dans l'organisme humain de l'immunité (2) provoquée par l'anatoxine tétanique. *Mais cette anatoxine nous paraît dès maintenant tout indiquée au début d'une campagne pour immuniser solidement et probablement pour toute la durée de cette campagne tous les combattants. On évitera ainsi à ceux-ci non seulement le tétanos, mais les injections répétées de sérum.*

ANATOXINES BOTULINIQUES ET DES ANAÉROBIES DE LA GANGRÈNE GAZEUSE. — Dès nos premières publications, Weinberg et ses collaborateurs Goy et A. R. Prévot (3), confirmant d'ailleurs nos données sur la méthode de flocculation, se sont préoccupés de les étendre à la toxine botulinique et aussi aux toxines des anaérobies de la gangrène gazeuse; ils ont fait connaître que ces toxines étaient susceptibles d'être converties en anatoxines (4)

(1) On savait déjà qu'un cheval immunisé contre le tétanos (pour la production de l'antitoxine) et qui est resté pendant de longues années sans recevoir d'injections de toxine peut supporter impunément une grosse dose de toxine active. Son sérum, qui ne contenait plus que des traces d'antitoxine à peine décelables, voit sa teneur en unités antitoxiques remonter immédiatement.

(2) Nous n'avons pas ici de réaction comparable au Schick, qui rend si facile la constatation de l'immunité antidiphtérique.

(3) Nous renvoyons pour tous détails aux publications de ces expérimentateurs.

(4) Weinberg et Goy viennent de montrer récemment, ainsi que nous l'avions indiqué pour l'anatoxine diphtérique, que les résultats obtenus avec une anatoxine botulinique au formol sont meilleurs que ceux obtenus avec une anatoxine à l'iode.

qui, comme les anatoxines diphtérique et tétanique, trouvent leur emploi dans la préparation des sérums antituberculeux et antigangreneux. Les résultats qu'ils obtiennent dans leurs essais chez les animaux leur font espérer l'application à l'homme de la vaccination antigangreneuse à l'aide d'anatoxines spécifiques. Peut-être dans cet ordre d'idées pourrait-on associer anatoxines gangreneuse et tétanique?

On pourra aussi songer à se servir des anatoxines obtenues avec les toxines des microbes de la gangrène gazeuse (v. septique, par exemple), ou de certains anaérobies qui s'en rapprochent beaucoup, *b. Chauvoei* en particulier (rappelons à ce propos les anciens travaux de Roux) pour protéger les animaux domestiques contre les affections correspondantes.

ANATOXINES CORRESPONDANT AUX TOXALBUMINES VÉGÉTALES.

Certains poisons d'origine végétale sont très semblables par leurs propriétés aux toxines microbiennes. Il était donc intéressant à un point de vue, ici plutôt théorique, de rechercher si ces poisons peuvent être transformés en anatoxines. Dans ce but, nous nous sommes adressé à l'abrine, toxalbumine végétale extraite de l'*Abrus precatorius*.

Préparons donc tout d'abord une solution d'abrine (1) que nous additionnons de formol (4 à 5 cent. cubes p. 1.000). Après cinq semaines de séjour à la température de l'étuve (38° à 40°), cette solution, qui primitivement tuait en quarante-huit heures un cobaye de 300 grammes à la dose de 1/20 de cent. cube, ne se montre plus toxique pour cet animal, même à la dose de plusieurs centimètres cubes. Injectons sous la peau d'un certain nombre de cobayes 1 cent. cube de cette abrine ainsi rendue atoxique; un mois après cette unique injection, leur immunité est telle qu'ils supportent facilement 15 à 20 doses mortelles pour un cobaye neuf (2).

(1) D'après la technique indiquée autrefois par Calmette et Delarde.

(2) Rehn fait agir le formol sur de l'abrine de Merk en poudre. D'après cet auteur, au bout de quarante-huit heures, on peut injecter l'abrine à n'importe quelle dose sans pouvoir produire l'immunité. Il est probable, sinon certain, que dans ce cas le formol, agissant en trop fortes proportions et trop brutalement, a détruit à la fois et le pouvoir toxique et le pouvoir antigène de l'abrine ainsi traitée.

Si maintenant avec ce même produit nous faisons à des lapins une série de six injections sous-cutanées de 3 à 6 cent. cubes chacune à quatre ou cinq jours d'intervalle, ces animaux résistent cinq semaines après la première injection à plus de 100 doses mortelles (1).

L'immunité se traduit d'ailleurs par une production notable d'antiabrine puisque, à ce moment, 1 cent. cube du sérum de ces lapins est capable de neutraliser 30 ou 40 doses mortelles (pour le cobaye).

Cette antiabrine mise, *in vitro*, en présence d'abrine ou d'anatoxine abrique donne lieu à la réaction de floculation qui peut être utilisée pour le titrage de l'un ou l'autre de ces produits, dans des conditions analogues à celle du dosage de l'anatoxine et de l'antitoxine diphtériques.

ANATOXINES CORRESPONDANT AUX VENINS.

Peut-on, par le ou les mêmes procédés qui peuvent transformer les toxines en anatoxines, enlever aux venins, poisons d'origine animale, leur toxicité, tout en leur conservant leur qualité d'antigènes.

Adressons-nous pour être fixé au venin de cobra. Dissolvons 50 centigrammes de venin de cobra sec dans 200 cent. cubes d'eau physiologique. Cette solution, qui tue en cinq heures un lapin de 1.800 grammes à la dose de 0 c. c. 5 (soit 1 milligr. 25 de venin sec) en injection sous-cutanée, ne se montre nullement nocive pour cet animal, même à la dose de 100 cent. cubes, lorsque, après l'avoir additionné d'aldéhyde formique [4 à 5 cent. cubes p. 1.000] (2), on lui a fait subir un séjour d'un mois environ à l'étude. Des lapins qui reçoivent sous la peau, à quatre ou cinq jours d'intervalle, des doses progressivement croissantes (5, 10, 12, 15, 20 cent. cubes) de

(1) Avec une solution d'abrine non modifiée, il faut au moins six mois d'injections multiples et beaucoup de prudence pour arriver sensiblement au même résultat (Calmette et Delarde).

(2) Il faut tenir compte de la richesse souvent très différente des solutions de venin en protéines (spécifiques ou d'impuretés); aussi, la dose de formol à ajouter est-elle très variable suivant les solutions; c'est ainsi que pour certaines d'entre elles il nous a fallu jusqu'à 6 cent. cubes et 8 cent. cubes p. 1.000 d'aldéhyde formique pour obtenir la disparition de la toxicité.

cette solution devenue inoffensive (1) sont capables de supporter à la fin de cette période d'immunisation jusqu'à 40 doses mortelles de venin (50 milligrammes). Si avant d'éprouver ainsi ces animaux on les a saignés, on constate que leur sérum neutralise déjà, sous le volume de 1 cent. cube, 5 à 10 doses mortelles (pour le cobaye) de venin, soit environ 2 milligrammes (2).

Ainsi, des poisons d'origine animale, tel le venin de cobra, des toxalbumines végétales, telle l'abrine, sont comme les toxines microbiennes susceptibles d'être modifiées au point de se montrer d'une innocuité parfaite vis-à-vis de l'organisme vivant, et cela, pour le plus grand avantage de l'immunité.

Nous sommes donc en possession d'une méthode générale permettant de transformer à volonté les antigènes les plus toxiques en antigènes inoffensifs, ou, comme nous les avons appelés, en « anatoxines », dont le pouvoir immunisant peut être facilement évalué in vitro par la réaction de floculation, et qui peuvent être utilisés, soit dans le domaine expérimental, soit encore et surtout dans la thérapeutique préventive et même curative de certaines maladies de l'homme et des animaux.

BIBLIOGRAPHIE

CALMETTE. *Les Venins*.

CALMETTE et DELARDE. *Ces Annales*, 40, p. 675.

CALMETTE et MASSOL. *Ces Annales*, 23, p. 155.

DARRÉ, LOISEAU et LAFFAILLE. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 43, séance du 9 mai 1924.

DESCOMBEY. *C. R. Soc. Biol.*, 91, 1924, p. 233.

DUJARDIN-BEAUMETZ et MALHERBE. *C. R. Soc. Biol.*, 90, 1924, p. 459.

GLENNY et OKELL. *The Journ. of Path. a. Bact.*, 27, 1924, p. 187.

GLENNY, BARRARA, HOPKINS et POPE. *The Journ. of Path. a. Bact.*, 27, 1924, p. 261.

HENSEVAL et NÉLIS. *C. R. Soc. Biol.*, 91, 24 octobre 1924.

LEREBoullet et JOANNON. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, 48, 1924.

L. MARTIN. *Bull. Acad. de Méd.*, avril 1924.

(1) Déjà Calmette avait songé à diminuer la toxicité des venins, et du venin de cobra en particulier, en additionnant ce dernier, avant de l'injecter, d'hypochlorite de chaux. Par ce procédé, on pouvait vacciner un lapin contre 20 doses mortelles en trois mois.

(2) Ici encore, on pourrait également mettre en œuvre la réaction de floculation suivant l'idée qu'en avait émise Calmette et Massol dès 1909 (précipitation).

- PARK et ZINGHER. Voir en particulier *Journ. of the Am. Med. Assoc.*, novembre 1922; *Soc. Exp. Biol. et Méd.*, avril 1923.
- RAMON. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, p. 661-711-813; **89**, 1923, p. 2; *C. R. Acad. des Sciences*, **157**, 1923, p. 1338; **158**, 1924, p. 1136; **159**, 1924, p. 422 et 485; *Ces Annales*, **37**, 1923, p. 1001; **38**, 1924, p. 1.
- REHNS. *C. R. Soc. Biol.*, 1914.
- J. RENAULT et P.-P. LÉVY. *Soc. Pédiatrie*, 16 décembre 1924.
- RENAUX. *C. R. Soc. Biol.*, **39**, 1923, p. 93, et **90**, 1924, p. 965.
- ROUBINOVITCH, LOISEAU et LAFFAILLE. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, **48**, séance du 9 mai 1924.
- ROUX. *Ces Annales*, 1888.
- SCHMIDT. *C. R. Soc. Biol.*, **88**, 1923, p. 105, et **90**, 1924, p. 1179.
- SCHOLTZ. *Centralb. f. Bakt.*, **91**, 1923, p. 72; *Deutsch. Med. Woch.*, 1923, p. 1512.
- SORDELLI et SERPA. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, 1924.
- WEINBERG, PREVOT et GOY. *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, p. 329.
- WEINBERG et GOY. *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, p. 269; **91**, p. 148 et 1140.
- WEINBERG et PREVOT. *C. R. Acad. des Sciences*, **68**, 1924, p. 227.
- ZOELLER. *Bull. Soc. Méd. Hôp.*, séance du 9 mai 1924; *C. R. Soc. Biol.*, **91**, séance du 21 juin, 3 et 25 juillet 1924; *Bull. Acad. de Méd.*, **92**, séance du 2 décembre 1924.

LA PHAGOCYTOSE ET LES RÉACTIONS DES CELLULES DANS L'IMMUNITÉ LOCALE

par S. METALNIKOV et K. TOUMANOFF.

Dans nos publications précédentes (1), nous avons démontré quel est le rôle des éléments cellulaires dans l'immunité chez les animaux inférieurs, particulièrement chez les insectes. Cette immunité cellulaire se réalise par les voies suivantes : 1° chimiotaxie ; 2° phagocytose ; 3° formation des plasmodes et des cellules géantes ; 4° formation des capsules autour du foyer contagieux ; 5° formation des abcès qui favorisent l'évacuation des microbes au dehors.

Toutes ces réactions sont spécifiques pour chaque microbe injecté, c'est-à-dire que chaque microbe produit une série de réactions bien déterminées. Ces réactions diffèrent par l'intensité, par la durée et par la sensibilité que manifestent les différentes cellules envers le microbe ou la substance injectés. C'est ainsi que les réactions produites par les vibrions cholériques sont différentes de celles qui sont produites par les bacilles tuberculeux ou par le charbon.

Après l'immunisation, toutes ces réactions des cellules deviennent plus intenses, plus coordonnées, plus efficaces. On peut dire que l'immunisation (2) est une sensibilisation, une mobilisation des différentes cellules contre les microbes ennemis.

N'y a-t-il pas quelque chose d'analogue dans l'immunité locale démontrée par les travaux du professeur Besredka et de ses élèves ?

Dans sa dernière publication (3), Besredka nous donne une explication de ces phénomènes. Il pense que les phagocytes, en digérant les corps des microbes, libèrent l'antivirus qui va

(1) Ces *Annales*, 1922, 1924.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 88, 1923; *Ibid*, 2 juin 1923.

(3) *La Presse médicale*, juillet 1924, p. 587.

rejoindre les cellules pour lesquelles il ressent une affinité élective. « Après s'être ainsi combinées avec l'antivirus, les cellules réceptives de la peau ou de l'intestin deviennent impropres à entrer dans une nouvelle combinaison; elles deviennent *eo ipso* réfractaires, c'est-à-dire vaccinées contre une nouvelle invasion de virus. »

Mais cette hypothèse n'explique pas comment, par quels moyens, ces cellules réfractaires se débarrassent des microbes introduits dans une région immunisée.

Pour résoudre ce problème, nous avons entrepris toute une série d'expériences sur les cobayes, que nous avons infectés avec des staphylocoques très virulents que nous devons à M. Urbain.

Inoculé sous la peau, ce staphylocoque provoque une lésion cutanée typique. Après une période silencieuse, on voit apparaître un œdème au niveau de l'inoculation. La peau devient rouge noirâtre. On assiste ensuite à la formation d'un tissu gangréneux qui, en se détachant, laisse à nu une large escarre suppurée. On sait depuis les expériences de Besredka et Urbain (1) qu'il est possible de vacciner le cobaye et le lapin contre les staphylocoques en utilisant des cultures chauffées et des filtrats de cultures.

Voici, pour fixer les idées, quelques expériences faites avec les staphylocoques et leurs filtrats.

EXPÉRIENCE I.

Le cobaye 74 reçoit dans le *péritoine* 1 cent. cube de staphylocoques chauffés à 58°.

Le lendemain, on lui injecte, *sous la peau*, 1 cent. cube d'une émulsion très épaisse d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose.

L'animal reste vivant, mais il donne une réaction très forte.

Le cobaye 75 reçoit dans la *peau* (intradermique) 0 c. c. 5 de staphylocoques chauffés.

Le lendemain, on lui injecte *sous la peau* 1 cent. cube de staphylocoques vivants.

(1) *C. R. Soc. Biol.*, juillet 1924.

L'animal reste vivant. Réaction locale passagère.

Le cobaye 81 reçoit dans *la peau* 0 c. c. 5 de staphylocoques chauffés.

Le lendemain, on lui injecte dans *le péritoine* 1 cent. cube de staphylocoques vivants.

L'animal meurt dans quarante-huit heures.

Le cobaye 82 reçoit dans *le péritoine* 1 cent. cube de staphylocoques chauffés.

Le lendemain, on lui injecte dans *le péritoine* 1 cent. cube de staphylocoques vivants.

L'animal reste vivant.

Le cobaye 83 (témoin) reçoit dans le péritoine 1 cent. cube de staphylocoques vivants.

Il meurt le lendemain.

Le cobaye 84 (témoin) reçoit sous la peau 1 cent. cube de staphylocoques vivants.

Il meurt dans trois jours.

EXPÉRIENCE II.

Le cobaye 23 reçoit sous la peau 1 cent. cube de staphylocoques chauffés.

Le lendemain, on lui injecte dans *le péritoine* 2 cent. cubes d'une émulsion épaisse de staphylocoques vivants.

Il meurt le lendemain.

Le cobaye 24 reçoit sous la peau 3 cent. cubes de filtrat de staphylocoques vivants.

Quarante-huit heures après, on lui injecte sous la peau 2 cent. cubes de staphylocoques vivants.

Il reste vivant.

Le cobaye 27 reçoit dans *le péritoine* 3 cent. cubes de filtrat de staphylocoques.

Le lendemain, on lui injecte dans *le péritoine* 2 cent. cubes de staphylocoques vivants.

Il reste vivant.

Le cobaye 28 (témoin) reçoit dans le péritoine 2 cent. cubes de staphylocoques vivants.

Il meurt le lendemain.

Toutes ces expériences confirment les travaux de Besredka,

Urbain et beaucoup d'autres sur existence de l'immunité locale. Les animaux immunisés sous la peau ou dans la peau résistent bien si le virus est introduit sous la peau. En introduisant le vaccin dans le péritoine, on obtient l'immunité locale du péritoine.

Mais cette immunité locale (surtout si l'immunisation est faite plusieurs fois ou en plusieurs endroits) peut se répandre avec le temps et donner une immunité générale.

EXPÉRIENCE III.

Le cobaye 70 reçoit dans la *peau* (intraderm.) sur le *côté droit* 0 c. c. 5 de filtrat de staphylocoques, puis sur le *côté gauche* 0 c. c. 5 de bouillon ou de la solution physiologique.

Le lendemain, on lui injecte dans la peau, aux endroits d'immunisation locale, sur les côtés droit et gauche, 0 c. c. 5 d'une émulsion très épaisse de staphylocoques vivants.

Vingt-quatre, quarante-huit heures après l'inoculation, on trouve sur le *côté gauche* (non immunisé) un œlème et un grand abcès.

Sur le *côté droit* (immunisé), on trouve un petit abcès.

Nous avons étudié sur les frottis le pus des deux abcès. Tandis que dans le pus du côté immunisé nous avons trouvé une quantité de polynucléaires remplis de microbes à moitié digérés, dans le pus du côté non immunisé il y avait une masse de staphylocoques en dehors des phagocytes. Et beaucoup de ces phagocytes sont en état de cytolise. Nous avons répété plusieurs fois cette expérience et toujours avec le même résultat.

Tous ces phénomènes sont encore plus démonstratifs sous la peau des animaux immunisés. Nous avons fait des coupes qui nous ont démontré que l'évolution d'un abcès, la destruction des staphylocoques et la formation des capsules se passent beaucoup plus vite dans les endroits immunisés.

Tandis que chez les animaux non immunisés on voit apparaître sous la peau au niveau de l'inoculation un grand exsudat plein de microbes et de polynucléaires, chez les animaux immunisés on assiste toujours à la formation d'un abcès, bien limité, qui ne contient presque pas de microbes libres.

Tout prouve que sur le côté immunisé ainsi que chez les

animaux immunisés les cellules étaient bien mobilisées et ont facilement surmonté l'invasion des microbes.

Sur le côté gauche (non immunisé), au contraire, ce sont les microbes qui ont pris le dessus.

Nous avons souvent fait les mêmes observations dans l'exsudat péritonéal des animaux immunisés.

EXPÉRIENCE IV.

Le cobaye 29, immunisé dans le péritoine, reçoit, dans le péritoine, 3 cent. cubes d'une émulsion très épaisse de staphylocoques sur gélose de vingt-quatre heures.

Le cobaye 77 (témoin, non immunisé) reçoit la même dose dans le péritoine.

L'exsudat péritonéal des deux cobayes est étudié sur les frottis colorés. Pendant la première heure qui suit l'innoculation, on ne trouve presque pas de leucocytes dans le péritoine. Dès la deuxième et la troisième heures, les globules blancs apparaissent rapidement et en grande quantité (beaucoup plus vite chez les animaux immunisés que chez les animaux non immunisés). La phagocytose apparaît chez les animaux immunisés une heure, une heure et demie après l'inoculation. Chez les témoins, la phagocytose fait souvent défaut deux heures, deux heures et demie après.

Nous avons étudié à part l'index phagocytaire des polynucléaires et des mononucléaires, en comptant, sur les préparations colorées, le pourcentage des leucocytes (mononucléaires ou polynucléaires) ayant englobé les microbes.

COBAYE 29 IMMUNISÉ

COBAYE 77, TÉMOIN, NON IMMUNISÉ

Une heure après l'inoculation :

Très peu de cellules.

Pas de cellules.

Deux heures après l'inoculation :

Polynucléaires	94,3 p. 100	Polynucléaires	98 p. 100
Index phagocytaire	92 —	Index phagocytaire	100 —
Mononucléaires	0 —	Mononucléaires	0 —
Lymphocytes	5,7 —	Lymphocytes	2 —

COBAYE 29 IMMUNISÉ

COBAYE 77, TÉMOIN, NON IMMUNISÉ

Cinq heures après l'inoculation :

Polynucléaires	100	p. 100	Polynucléaires	100	p. 100
Index phagocytaire. . .	17	—	Index phagocytaire. . .	100	—
Mononucléaires.	0	—	Mononucléaires.	0	—
Lymphocytes.	0	—	Lymphocytes.	0	—
Pas de microbes libres.			Masse de microbes libres.		

Sept heures après l'inoculation :

Polynucléaires	93,4	p. 100	Polynucléaires	100	p. 100
Index phagocytaire. . .	8	—	Index phagocytaire. . .	100	—
Mononucléaires.	1,3	—	Mononucléaires.	0	—
Lymphocytes.	3,3	—	Lymphocytes.	0	—
Pas de microbes libres.			Masse de microbes libres.		

Vingt-quatre heures après l'inoculation :

Polynucléaires	86	p. 100	Meurt vingt heures après l'infection.		
Index phag. polyn. . . .	9	—			
Mononucléaires.	12,7	—			
Index phag. monon. . .	1	—			
Lymphocytes.	1,3	—			

Quarante-huit heures après l'inoculation :

Polynucléaires	63,6	p. 100
Index phag. polyn. . . .	0	—
Mononucléaires.	20,3	—
Index phag. monon. . .	14	—
Lymphocytes.	17	—

Soixante-douze heures après l'inoculation :

Polynucléaires	70	p. 100
Index phag. polyn. . . .	0	—
Mononucléaires.	4,9	—
Index phag. monon. . .	0	—
Lymphocytes.	25,1	—
Pas de microbes.		

EXPÉRIENCE V.

Cobaye 73 reçoit dans le péritoine 3 cent. cubes de la culture chauffée de staphylocoques.

Dix jours après on lui injecte dans le péritoine 3 cent. cubes de staphylocoques virulents.

Cobaye 50 (témoin, non immunisé) reçoit la même dose de staphylocoques virulents dans le péritoine.

COBAYE 73 IMMUNISÉ

COBAYE 50 NON IMMUNISÉ

Une demi-heure après l'inoculation :

Pas de leucocytes.

Pas de leucocytes.

Une heure et demie après l'inoculation :

Polynucléaires.	93,2 p. 100	Très peu de leucocytes.
Index phagocytaire	41 —	
Mononucléaires	0 —	
Lymphocytes	6,8 —	

Trois heures après l'inoculation :

Polynucléaires.	84 p. 100	Polynucléaires	86,3 p. 100
Index phag. polyn.	15 —	Index phagocytaire. . . .	97 —
Mononucléaires	0 —	Mononucléaires.	0 —
Lymphocytes ?	16 —	Lymphocytes.	13,7 —
Pas de microbes libres.			

Quatre heures après l'inoculation :

Polynucléaires.	93,3 p. 100	Polynucléaires	95 p. 100
Index phag. polyn.	14 —	Index phag. polyn.	98 —
Mononucléaires	3,3 —	Mononucléaires.	8 —
Lymphocytes	3,4 —	Lymphocytes.	5 —
Pas de microbes libres.		Masse de microbes.	

Six heures après l'inoculation :

Polynucléaires.	81,6 p. 100	Polynucléaires	98,7 p. 100
Index phag. polyn.	11 —	Index phag. polyn.	100 —
Mononucléaires	8,6 —	Mononucléaires.	0 —
Lymphocytes	9,8 —	Lymphocytes.	11,3 —
		Masse de microbes.	

Vingt-quatre heures après l'inoculation :

Polynucléaires.	73,8 p. 100	Mort.
Index phag. polyn.	4 —	
Mononucléaires	15,3 —	
Index phag. monon.	2 —	
Lymphocytes	10,9 —	

Quarante-huit heures après l'inoculation :

Polynucléaires.	38,2 p. 100
Index phag. polyn.	2 —
Mononucléaires	30,2 —
Index phag. monon.	12 —
Lymphocytes	31,6 —

Si l'on compare les réactions des cellules dans le péritoine des animaux immunisés et non immunisés, on est frappé par ce fait que l'index phagocytaire chez les immunisés est beaucoup moins grand que chez les animaux neufs.

Tandis que chez les animaux neufs l'index phagocytaire a une tendance à s'accroître, au contraire, chez les animaux immunisés, il baisse rapidement. Quelle est l'explication de ce fait paradoxal?

Les adversaires de la théorie phagocytaire pourraient facilement l'utiliser comme un nouvel argument contre cette théorie.

De notre point de vue, ce fait s'explique autrement :

La diminution d'index phagocytaire chez les animaux immunisés est le résultat de la diminution et de la disparition des microbes dans le péritoine. Trois, cinq heures après l'injection, tous les microbes sont englobés par les phagocytes et à moitié digérés. On n'en trouve plus de libres dans le péritoine des animaux immunisés. Cependant, chez les animaux neufs, la quantité de microbes libres augmente progressivement et les phagocytes ne sont plus capables de les surmonter. C'est pourquoi tous les phagocytes sont bourrés de microbes.

Une seconde particularité que nous trouvons chez les immunisés, c'est l'apparition des mononucléaires : souvent trois, quatre heures après l'infection, on trouve déjà des macrophages. Vingt-quatre heures après, il y en a encore plus, et quarante-huit heures après on en trouve déjà 30 p. 100 et plus.

On pourrait comparer les macrophages à l'artillerie lourde qui ne vient que plus tard sur les champs de bataille mais aide beaucoup à gagner la victoire.

Il est intéressant de noter l'apparition en grande quantité des lymphocytes (v. Exp. V et VI). Sans aucun doute, ces cellules jouent aussi un rôle très important dans la lutte contre les microbes, car c'est grâce à elles que se forment dans les endroits les plus dangereux les barrières, les membranes et les capsules qui empêchent l'invasion des microbes dans les organes.

EXPÉRIENCE VI.

Cobaye 21 reçoit cinq fois de suite, dans le péritoine, des émulsions chauffées de staphylocoques. Deux semaines après la dernière injection, il reçoit, dans le péritoine, 3 cent. cubes d'une émulsion très épaisse de staphylocoques peu virulents.

Cobaye 57 reçoit cinq fois, sous la peau, des émulsions chauffées de staphylocoques. Deux semaines après la dernière injection il reçoit, dans le péritoine, 3 cent. cubes d'une émulsion très épaisse de staphylocoques vivants.

Cobaye 22 (témoin) reçoit la même dose de staphylocoques vivants dans le péritoine.

Nous avons étudié la formule leucocytaire ainsi que l'index phagocytaire dans les exsudats du péritoine des trois cobayes infectés :

COBAYE 21
immunisé dans le péritoine

COBAYE 57
immunisé sous la peau

COBAYE 22
témoin non immunisé

Une heure après l'injection :

Très peu de cellules.

Pas de cellules.

Pas de cellules.

Trois heures après l'injection :

	P. 100		P. 100		P. 100
Polynucléaires . .	100	Polynucléaires . .	93	Polynucléaires . .	98
Index phag. polyn.	100	Index phag. . . .	100	Index phag. . . .	100
Mononucléaires. .	0	Mononucléaires. .	0	Mononucléaires. .	0
Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	7	Lymphocytes . . .	2
Beaucoup de micr. lib.		Masses de micr. lib.		Masses de micr. lib.	

Quatre heures et demie après l'injection :

Polynucléaires . .	100	Polynucléaires . .	98	Polynucléaires . .	96
Index phag. polyn.	76	Index phag. polyn.	76	Index phag. . . .	100
Mononucléaires. .	0	Mononucléaires. .	2	Mononucléaires. .	0
Lymphocytes. . .	0	Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	3,5
Presque pas de micr. lib.		Peu de micr. libres.		Beaucoup de micr. lib.	

Six heures après l'injection :

Polynucléaires . .	95	Polynucléaires . .	96	Polynucléaires . .	100
Index phag. polyn.	50	Index phag. . . .	55	Index phag. . . .	98
Mononucléaires. .	5	Mononucléaires. .	4	Mononucléaires. .	0
Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	0
Pas de micr. libres.		Très peu de microbes.		Microbes libres.	

COBAYE 21		COBAYE 57		COBAYE 22	
immunisé dans le péritoine		immunisé sous la peau		témoin non immunisé	
—		—		—	
<i>Vingt-quatre heures après l'injection :</i>					
Polynucléaires . .	81	Polynucléaires . .	86	Polynucléaires . .	92
Index phag. polyn.	43	Index phag. polyn.	41	Index phag. polyn.	52
Mononucléaires. .	49	Mononucléaires. .	14	Mononucléaires. .	6
Index phag. mon..	50	Index phag. mon..	15	Index phag. mon..	22
Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	1	Lymphocytes . . .	2
		Pas de microbes.		Peu de microbes.	

<i>Quarante-huit heures après l'injection :</i>					
Polynucléaires . .	58	Polynucléaires . .	52	Polynucléaires . .	54
Index phag. polyn.	40	Index phag. polyn.	3	Index phag. polyn.	20
Mononucléaires. .	42	Mononucléaires. .	44	Mononucléaires. .	46
Index phag. mon..	33	Index phag. mon..	45	Index phag. mon..	64
Lymphocytes . . .	0	Lymphocytes . . .	4	Lymphocytes . . .	0
				Microbes rares.	

<i>Quatre jours après l'injection :</i>					
Polynucléaires . .	36	Polynucléaires . .	31	Polynucléaires . .	21
Index phag. polyn.	0	Index phag. polyn.	0	Index phag. polyn.	2
Mononucléaires. .	38	Mononucléaires. .	55	Mononucléaires. .	76
Index phag. mon..	24	Index phag. mon..	16	Index phag. mon..	75
Lymphocytes . . .	26	Lymphocytes . . .	14	Lymphocytes . . .	3

Ces expériences nous démontrent qu'il y a une différence non seulement entre le cobaye immunisé dans le péritoine et le cobaye neuf, mais aussi entre le cobaye immunisé dans le péritoine et le cobaye immunisé sous la peau. Les réactions cellulaires du cobaye immunisé dans le péritoine sont plus intenses et amènent plus vite la destruction des microbes.

Nous avons obtenu les mêmes résultats avec le charbon. Nous avons immunisé nos cobayes en leur injectant de petites doses du vaccin n° 1 dans le péritoine et sous la peau. Vingt jours après la dernière injection, les cobayes ont reçu, dans le péritoine, 2 cent. cubes d'une émulsion du vaccin n° 1 (culture sur gélose de vingt-quatre heures).

Nous avons été frappés, dans ces expériences, par la disparition très rapide des bactéries, même chez les animaux non vaccinés. Quarante à soixante minutes après l'injection, tous les microbes disparaissaient du péritoine. Comme nous l'avons vu sur de nombreuses préparations, la plus grande partie des bactéries se gonflent et se bactériolysent, les autres se fixent sur l'épiploon.

Si la dose est assez grande, les bactéries réapparaissent de nouveau chez les animaux non immunisés et donnent la mort. Chez les immunisés elles disparaissent complètement.

Pour bien étudier la phagocytose il faut injecter dans le péritoine de grandes quantités de bactéries charbonneuses, émulsionnées en bouillon. Ce n'est qu'avec ces émulsions qu'il nous a été possible de trouver les bactéries dans le péritoine, même deux ou quatre heures après l'injection. Nous donnons ci-dessous la description d'une de ces expériences.

EXPÉRIENCE VII.

Cobaye 36 a reçu deux fois *dans le péritoine* de petites doses du vaccin n° 1. Vingt jours après la dernière injection il reçut *dans le péritoine* 2 cent. cubes d'une émulsion du vaccin n° 1 (culture sur gélose de vingt-quatre heures).

Cobaye 44 a reçu deux fois *dans la peau* 2 cent. cubes du vaccin n° 1. Vingt jours après la dernière injection il reçut *dans le péritoine* 2 cent. cubes d'une émulsion du vaccin n° 1.

Cobaye 57 (témoin) non vacciné, reçoit la même dose *dans le péritoine*.

COBAYE 36
immunisé dans le péritoine

COBAYE 44
immunisé dans la peau

COBAYE 57
témoin, non immunisé

Une heure après l'injection :

P. 100		
Polynucléaires. . .	67	Très peu de leucocytes.
Index phag.	6	Beaucoup de bact.
Mononucléaires . .	0	Très peu de leucocytes.
Lymphocytes . . .	33	Grande quantité de bactéries.
Peu de bactéries.		

Deux heures après l'injection :

P. 100		P. 100	P. 100
Polynucléaires. . .	80	Polynucléaires. . .	84
Index phag. polyn..	30	Index phag. polyn.	0
Mononucléaires . .	4	Mononucléaires . .	0
Lymphocytes. . . .	16	Mononucléaires . .	4
Très peu de bactéries		Lymphocytes . . .	16
libres. Bactériolyse.		Lymphocytes . . .	16
		Beaucoup de bactéries.	
		Bactériolyse.	
		Masses de bact. libres.	

COBAYE 36
immunisé dans le péritoine

COBAYE 44
immunisé dans la peau

COBAYE 57
témoin, non immunisé

Trois heures après l'injection :

Polynucléaires. . . 71	Polynucléaires. . . 97	Polynucléaires. . . 79
Index phag. polyn.. 14	Index phag. polyn.. 0	Index phag. polyn.. 0
Mononucléaires . . 29	Mononucléaires . . 0	Mononucléaires . . 0
Lymphocytes . . . 0	Lymphocytes . . . 3	Lymphocytes . . . 21
Presque pas de bac- téries libres. Bacté- riolyse.	Bactériolyse. Peu de bactéries libres.	Beaucoup de bactéries libres.

Cinq heures après l'injection :

Polynucléaires. . . 78	Polynucléaires. . . 97	Polynucléaires. . . 84
Index phag. polyn.. 8	Index phag. polyn.. 0	Index phag. polyn.. 2
Mononucléaires . . 3	Mononucléaires . . 0	Mononucléaires . . 2
Lymphocytes . . . 19	Lymphocytes . . . 3	Lymphocytes . . . 14
Pas de bact. libres.	Peu de bact. libres.	Beaucoup de bact. lib.

Huit heures après l'injection :

Polynucléaires. . . 68	Polynucléaires. . . 93	Polynucléaires. . . 69
Index phag. polyn.. 0	Index phag. polyn.. 0	Index phag. polyn.. 0
Mononucléaires . . 3	Mononucléaires . . 0	Mononucléaires . . 3
Lymphocytes . . . 29	Lymphocytes . . . 7	Lymphocytes . . . 28
	Peu de bactéries.	Moins de bact. libres.
		Pas de phagocytose.

Vingt-quatre heures après l'injection :

Pas de bactéries et pas de leucocytes dans l'exsudat.	Polynucléaires. . . 85	Polynucléaires. . . 86
Vivant.	Mononucléaires . . 4	Mononucléaires . . 2
	Lymphocytes . . . 11	Lymphocytes . . . 42
	Vivant.	Peu de bactéries libres.
		Pas de phagocytose.
		Mort.

Ainsi nous pouvons dire que l'immunisation locale n'est qu'une stimulation locale des différentes cellules qui prennent part à la défense organique.

Le nombre des cellules qui entrent en jeu, l'intensité des réactions et de la phagocytose sont beaucoup plus forts et plus rapides chez les animaux immunisés que chez les animaux normaux.

Nous ne nions pas non plus l'influence des humeurs qui contiennent souvent des substances favorisant cette défense (antitoxines, bactériolysines, opsonines, etc.). Mais l'apparition de

ces substances est un phénomène plus tardif, car ce sont les cellules qui doivent les préparer et les sécréter dans le sang.

Ainsi nous pensons qu'à la base de toute immunité (générale et locale) chez les animaux inférieurs et supérieurs se trouvent l'activité des cellules et les réactions défensives de ces cellules qui se dirigent vers les microbes, les englobent, les entourent de tous côtés et les digèrent si c'est possible; si elles ne parviennent pas à digérer les microbes, elles produisent des abcès pour les rejeter au dehors, ou elles construisent des barrières et des capsules pour les isoler et les empêcher de se propager dans l'organisme.

COMPARAISON
DU SPIROCHÈTE DES RATS D'AMSTERDAM
AVEC UNE SOUCHE FRANÇAISE
DE SPIROCHÉTOSE ICTÉRO-HÉMORRAGIQUE

par C. BONNE.

J'ai profité d'un stage à l'Institut Pasteur pour comparer une souche de Spirochètes, isolée par Schüffner et Kuenen chez les Rats d'Amsterdam (souche A), avec la souche de spirochétose ictéro-hémorragique du laboratoire Pettit (souche P). Cette dernière souche est employée pour les sérodiagnostics de spirochétose ictéro-hémorragique qui sont demandés au service. Elle est agglutinée par le sérum des malades et donne une réaction des immunisines positive avec ces sérums; on trouvera son histoire dans une communication de A. Pettit à l'Académie de Médecine, 6 novembre 1923.

I. — Morphologie. Cultures.

Les premières cultures de la souche A, obtenues dans le milieu sérum de Lapin dilué six fois à l'eau physiologique, étaient moins riches que celles de la souche P; mais, pendant trois ou quatre mois, la densité augmenta graduellement, de telle sorte qu'au bout de ce laps de temps elle devint égale à celle de la souche P. La plupart des formes de cultures ont une longueur de 7 à 10 μ , mais, à côté des Spirochètes ordinaires, on rencontre des formes plus longues (jusqu'à 50 μ par exemple), puis des formes de dégénérescence. Au point de vue morphologique, les deux souches ne peuvent pas être distinguées. Dans les différents milieux de culture, elles poussent également bien. Si on abaisse le pH d'un milieu simple, par exemple d'une solution à 1 p. 1.000 de peptone Chapoteaut dans de l'eau de conduite additionnée de quelques gouttes de

sérum de Lapin, en y ajoutant de l'acide phosphorique, on trouve la même acidité d'arrêt pour les deux souches, soit de pH : 6,3 environ. Il n'est pas prouvé, d'ailleurs, que cette dernière valeur reste constante pour le même organisme dans toutes les circonstances. Si les milieux de culture sont rendus alcalins par le verre des tubes, on observe parfois un même degré d'inhibition pour les deux souches. Elles ne poussent plus dans un milieu qui commence à colorer légèrement la phénol-phtaléine, tandis que d'autres *Leptospires* continuent à s'y multiplier.

Dans les cultures en sérum de Lapin dilué, on observe, à côté des chaînes ordinaires de multiplication à deux éléments, des chaînes de trois Spirochètes dans les deux souches. Dans ces chaînes, les Spirochètes peuvent changer leur position relative. Si, par exemple, trois Spirochètes *a*, *b* et *c* forment une chaîne $a-b-c$, l'extrémité du Spirochète *c*, qui est attaché à l'extrémité de *b*, peut se déplacer tout le long du corps de *b* et *a*, donnant ainsi une nouvelle série $c-a-b$. Dans le cas de la souche P, les Spirochètes de ces chaînes conservaient toujours l'aspect ordinaire et avaient un mouvement actif très net. La souche A a montré, pendant quelque temps, des chaînes se composant d'un plus grand nombre d'éléments, jusqu'à douze ; en outre, ces Spirochètes étaient plus minces que d'ordinaire et les extrémités plus ou moins effilées. Les points d'adhérence ne laissaient plus reconnaître les spires et étaient animés d'un mouvement de tressaillement extrêmement rapide. Ces chaînes ne s'enroulaient pas comme celles formées de deux ou trois éléments qu'on observe normalement ; elles flottaient lentement, plus ou moins passivement, dans le milieu ambiant. Les déplacements relatifs des Spirochètes se rencontraient aussi dans les longues chaînes de la souche A, de telle façon que, parfois, il en résultait des aspects en croix, en double croix, en étoile, en T, en H, etc. Jamais, ces chaînes ne se transformaient en un de ces amas de multiplication qui se présentent si souvent dans les cultures. J'ai observé parfois que tous les éléments des chaînes, formées de trois ou quatre Spirochètes, se détachaient à la fois et devenaient libres. Ces chaînes sont alors des formes de multiplication. C'est dans les tubes de culture les plus troubles qu'il faut chercher les longues chaînes à éléments nombreux.

J'ai constaté l'existence de chaînes comparables dans une autre souche de *Leptospires* d'origine complètement différente et, sans doute, ce caractère ne constitue pas une particularité pour la souche A.

II. — Virulence.

Les deux souches A et P sont très virulentes pour le Cobaye ; 0 c.c. 01 de culture tue déjà ce Rongeur, si la culture pousse bien. Cependant, on note, de temps à autre, des irrégularités qui restent difficiles à expliquer.

Les lésions produites chez le Cobaye par les deux souches sont les mêmes, ordinairement : l'ictère est plus intense dans le cas de la souche P, mais on sait que ce syndrome est extrêmement variable. Exceptionnellement, les Cobayes meurent sans avoir présenté d'ictère, aussi bien dans le cas de la souche P que dans le cas de la souche A. La période qui s'écoule entre l'inoculation de l'animal et la mort varie entre quatre et quinze jours environ avec une moyenne de six à huit jours, le plus souvent. Les Cobayes qui s'infectent et qui guérissent après avoir présenté de l'ictère sont extrêmement rares. On peut observer, dans une série de Cobayes morts avec ictère et avec hémorragies après l'injection d'une même dose du même virus, des animaux où on trouve des *Spirochètes* dans le foie en abondance et d'autres où on ne peut les déceler ni par examen direct à l'ultramicroscope ni par inoculations à de nouveaux Cobayes.

III. — Réactions sérologiques.

A. AGGLUTINATION. LYSE.

J'ai comparé l'action, sur les deux souches, d'une dizaine de sérums de malades, atteints de spirochétose ictéro-hémorragique provenant de différentes régions de la France. Je n'ai pas trouvé de différences sensibles. L'expérience n° 1 en fournit un exemple. Le sérum provenait d'un malade pour lequel le diagnostic était basé sur la clinique ; le sérodiagnostic fut positif avec la souche P et l'inoculation d'un Cobaye fut également

positive. Pour cette agglutination comparative, j'ai utilisé des cultures jeunes dans le même milieu (sérum de Lapin dilué, repiquées le même jour et diluées, si cela était nécessaire, de façon à obtenir la même densité par rapport au volume du milieu. L'agglutination des deux souches était très forte et sensible encore à $1/1.000.000$. La lyse, intense, s'observait jusqu'à $1/10.000$; et, même à $1/50.000$, des traces de lyse étaient encore visibles. Le sérum était resté en contact avec les Spirochètes pendant une heure à 37° . Ici, j'appelle agglutination la formation d'amas de Spirochètes et lyse la perte de la structure distincte de ces amas jusqu'à dissolution complète. Les tubes, mis à l'étuve à 30° pendant deux jours et examinés à ce moment pour la recherche des Spirochètes vivants, n'en montraient pas lorsque la proportion (pour les deux souches) dépassait $1/50.000$ de sérum.

A. Pettit prépare un sérum de Cheval antispirochètosique par injections répétées de cultures de la souche P. De nombreux cliniciens ont signalé une action thérapeutique de ce sérum pour l'homme. Ce sérum agglutine les deux souches jusqu'à $1/100.000$; la lyse commence à $1/1.000$ pour les deux souches. Les détails de cette expérience (n° 2) sont donnés ci-dessous.

B. RÉACTIONS DES IMMUNISINES AVEC LES DEUX SOUCHES.

On peut doser l'action protégeante des sérums de malades atteints de spirochètose ictéro-hémorragique contre des injections de virus au Cobaye. En préparant des émulsions de foie de densité sensiblement égale en ce qui concerne le nombre des Spirochètes, j'obtenais des virus qui pouvaient servir pour une comparaison quantitative des propriétés immunisantes des sérums. Cette étude est devenue très difficile par suite de la fréquence de maladies épidémiques chez les Cobayes. Des quantités comparables de virus A et P étaient mélangées avec des quantités décroissantes d'un certain sérum, laissées en contact pendant un quart d'heure, puis injectées à des Cobayes autant que possible du même poids. Les expériences 3, 4 et 5 fournissent les détails pour deux sérums de malades atteints de spirochètose et le sérum de Cheval immunisé contre la souche P. Dans l'expérience n° 3, 0 c.c. 1 de sérum humain BB protège un

Cobaye de 350 grammes contre la souche A ; 0 c. c. 2 du même sérum protège contre la souche P. Pourtant un autre Cobaye qui reçoit 0 c. c. 10 de sérum meurt, mais le poids de cet animal était moins élevé que celui des autres, ce qui, peut-être, n'a pas été sans jouer un certain rôle.

Dans l'expérience suivante, la limite de protection pour la souche P est d'environ 0 c. c. 05 ; pour la souche A, d'environ 0 c. c. 01. Il faut remarquer pourtant que les Cobayes injectés avec la souche A avaient un poids plus élevé que ceux qui avaient été injectés avec la souche P. Le Cobaye n° 18, qui a reçu 0 c. c. 01 de sérum, est sensiblement plus gros ; il vaudra mieux le négliger et fixer la limite d'après le Cobaye suivant, le seul dont le poids fut égal à celui des animaux de la série injectée avec la souche P.

Dans l'expérience n° 5, 0 c. c. 2 de sérum de Cheval protège contre la souche A, tandis que la même dose retardait le moment de la mort, mais ne protégeait pas contre la souche P. Avec 0 c. c. 7 de sérum, l'animal survit.

En résumé, les limites comparables de protection étaient les suivantes :

	SOUCHE A	SOUCHE P
	—	—
Sérum BB en centimètres cubes	0,4	0,02
Sérum F en centimètres cubes	0,02	0,05
Sérum de Cheval en centimètres cubes . . .	0,2	0,7

L'action sur la souche A est aussi nette que sur la souche P.

IV. — Immunisations croisées.

Les expériences 6 et 7 montrent qu'un Cobaye immunisé par des injections croissantes de virus A résiste à l'injection d'une dose mortelle de virus P, tandis que les témoins meurent de spirochétose typique.

L'expérience 8 fournit un troisième exemple, mais ici l'animal meurt d'une maladie intercurrente dix jours après la dernière injection.

D'après l'expérience 9, un Cobaye immunisé par injections de culture P, maintenue pendant plusieurs jours à 37°, résiste

à une dose de virus A ordinairement mortelle. Malheureusement, tous les témoins moururent de maladies intercurrentes, excepté un gros Cobaye de 450 grammes qui n'avait reçu qu'un cinquième de la dose injectée au Cobaye immunisé. Ce gros Cobaye présenta de l'ictère pendant quatre jours, mais il ne mourut que le vingt-troisième jour, anictérique, faiblement hémorragique, sans Spirochètes dans le foie, avec quelques Spirochètes dans les reins. A l'autopsie, aucune lésion ne rappelait celles des maladies intercurrentes ordinaires; cependant, on ne peut pas dire que l'animal a succombé à une spirochètose typique. Il est certain qu'il avait montré de l'ictère tandis que le Cobaye immunisé par la souche P n'en présenta point, ce qui indique au moins une certaine immunité vis-à-vis la souche A.

Bien que les expériences relatées ici ne fournissent pas une preuve absolue de l'identité des Spirochètes observés chez les Rats d'Amsterdam et des microorganismes de la spirochètose ictéro-hémorragique française, plus spécialement de la souche de l'Institut Pasteur, on peut dire que jusqu'à présent il n'a été constaté aucun fait d'ordre physiologique ou pathologique permettant de distinguer, d'une façon constante, ces deux souches.

EXPÉRIENCE I. — **Agglutination et lyse des souches A et P par le sérum humain F. Cultures de trois jours en sérum de Lapin dilué. Même nombre de Spirochètes par unité de volume.**

DILUTIONS	AGGLUTINATION		LYSE		PRÉSENCE de Spirochètes vivants au bout de deux jours	
	Souche P	Souche A	Souche P	Souche A	Souche P	Souche A
1/100	+++	+++	+++	+++	—	—
1/300	+++	+++	+++	+++	—	—
1/500	+++	+++	+++	+++	—	—
1/1.000	+++	+++	+++	+++	—	—
1/3.000	+++	+++	+++	+++	—	—
1/5.000	+++	+++	+++	+++	—	—
1/10.000	+++	+++	+++	+++	—	—
1/50.000	+++	+++	+	+	+	++
1/100.000	+++	++	—	—	++	+++
1/1.000.000	+	+	—	—	+++	+++
1/10.000.000	—	—	—	—	+++	+++
1/100.000.000	—	—	—	—	+++	+++
Témoins	—	—	—	—	+++	+++

EXPÉRIENCE II. — Agglutination et lyse des souches A et P par le sérum de Cheval antispirochétosique préparé avec la souche P.

DILUTIONS	AGGLUTINATION		LYSE	
	Souche P	Souche A	Souche P	Souche A
1/100	+++	+++	+++	+++
1/200	+++	+++	+++	+++
1/300	+++	+++	+++	+++
1/1.000	+++	+++	+++	+++
1/10.000	+	+	+	+
1/100.000	+	+	—	—
1/1.000.000	—	—	—	—
1/10 000.000	—	—	—	—
1/100.000.000	—	—	—	—
Témoins	—	—	—	—

EXPÉRIENCE III. — Réactions des immunisines avec les souches P et A et le sérum humain antispirochétosique BB.

Cobaye 1 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A. Mort en sept jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 2 reçoit 0 c. c. 75 émulsion de foie A. Mort en six jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 3 reçoit 0 c. c. 25 émulsion de foie A. Mort en sept jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 4 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 1 sérum BB. Mort atypique en trente-deux jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 5 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 2 sérum BB. Mort atypique en soixante-quatorze jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 6 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 5 sérum BB. Mort atypique en vingt-cinq jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 7 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 1 cent. cube sérum BB. Mort atypique en dix-neuf jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 8 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 2 cent. cubes sérum BB. Mort atypique en vingt-cinq jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 9 reçoit 0 c. c. 5 émulsion de foie P. Mort en six jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 10 reçoit 0 c. c. 25 émulsion de foie P. Mort en cinq jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 11 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 01 sérum BB. Mort atypique en trois jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 12 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 02 sérum BB. Mort atypique en vingt jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Cobaye 13 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 10 sérum BB. Mort en douze jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.

Cobaye 14 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 50 sérum BB. Mort atypique en trois jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Quantités minimales comparables et protégeantes, A = 0 c. c. 10; P = 0 c. c. 02.

EXPÉRIENCE IV. — Réactions des immunisines avec les souches P et A et le sérum humain antispirochétosique F.

- Cobaye 15 reçoit 0 c. c. 01 émulsion de foie A. Mort en neuf jours. Spirochètes +; poids 450 grammes.
- Cobaye 16 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 001 sérum F. Mort en treize jours. Spirochètes +; poids 450 grammes.
- Cobaye 17 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 002 sérum F. Mort atypique en douze jours. Spirochètes —; poids 450 grammes.
- Cobaye 18 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 01 sérum F. Tué après trente jours. Poids 500 grammes.
- Cobaye 19 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 02 sérum F. Tué après trente jours. Poids 350 grammes.
- Cobaye 20 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 05 sérum F. Tué après trente jours. Poids 450 grammes.
- Cobaye 21 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 10 sérum F. Mort atypique en dix jours. Spirochètes —; poids 450 grammes.
- Cobaye 22 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 20 sérum F. Tué après trente jours. Poids 450 grammes.
- Cobaye 23 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie A + 0 c. c. 50 sérum F. Mort atypique en vingt-cinq jours. Spirochètes —; poids 400 grammes.
- Cobaye 24 reçoit 0 c. c. 01 émulsion de foie P. Mort en sept jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 25 reçoit 0 c. c. 10 émulsion de foie P. Mort en sept jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 26 reçoit 0 c. c. 25 émulsion de foie P. Mort en cinq jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 27 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 001 sérum F. Mort en huit jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 28 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 002 sérum F. Mort en six jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 29 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 01 sérum F. Mort atypique en quatorze jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 30 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 02 sérum F. Mort atypique en quatorze jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 31 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 05 sérum F. Mort atypique en trente-deux jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 32 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 10 sérum F. Mort atypique en huit jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 33 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 20 sérum F. Mort atypique en trente-six jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 34 reçoit 1 cent. cube émulsion de foie P + 0 c. c. 50 sérum F. Mort atypique en onze jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Quantités minimales comparables et protégeantes, A = 0 c. c. 2; P = 0 c. c. 5.

EXPÉRIENCE V. — Réactions des immunisines avec les souches A et P et un sérum de Cheval antisperochétosique.

- Cobaye 35 reçoit 0 c. c. 1 émulsion de foie A. Mort atypique en trois jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

- Cobaye 36 reçoit 0 c. c. 5 émulsion de foie A. Mort atypique en trois jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 37 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 002 sérum. Mort en huit jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 38 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 01 sérum. Mort atypique en huit jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 39 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 05 sérum. Mort atypique en huit jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 40 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 0 c. c. 2 sérum. Mort atypique en vingt-sept jours. Spirochètes —; 350 grammes.
- Cobaye 41 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie A + 1 cent. cube sérum. Mort atypique en huit jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

- Cobaye 42 reçoit 0 c. c. 10 émulsion de foie P. Mort en cinq jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 43 reçoit 0 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 001 sérum. Mort en cinq jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 44 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 002 sérum. Mort en cinq jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 45 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 01 sérum. Mort en quatre jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 46 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 05 sérum. Mort atypique en trois jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.
- Cobaye 47 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 20 sérum. Mort en neuf jours. Spirochètes +; poids 350 grammes.
- Cobaye 48 reçoit 1 c. c. 5 émulsion de foie P + 0 c. c. 7 sérum. Mort atypique en trente jours. Spirochètes —; poids 350 grammes.

Quantités minimales comparables et protégeantes, A = 0 c. c. 2; P = 0 c. c. 7.

EXPÉRIENCE VI.

- Cobaye 121 reçoit, le 12 janvier, 0 c. c. 0001 culture A.
- Cobaye 121 reçoit, le 29 janvier, 0 c. c. 05 culture A.
- Cobaye 121 reçoit, le 5 février, 0 c. c. 5 culture A.
- Cobaye 121 reçoit, le 12 février, 2 cent. cubes culture P. Reste en bon état.
- Témoin reçoit, le 12 février, 2 cent. cubes culture P. Mort en neuf jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.

EXPÉRIENCE VII.

- Cobaye 172 reçoit, le 12 février, 0 c. c. 2 culture A, peu virulente.
- Cobaye 172 reçoit, le 19 avril 1 cent. cube culture P. Reste en bon état.
- Témoin 1 reçoit, le 19 avril, 1 cent. cube culture P. Mort en quatre jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.
- Témoin 2 reçoit, le 19 avril, 1 cent. cube culture P. Mort en quatre jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.
- Témoin 3 reçoit, le 19 avril, 1 cent. cube culture P. Mort en cinq jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.

EXPÉRIENCE VIII.

Cobaye 149 reçoit, le 19 décembre, 0 c. c. 2 culture A. Ictère 28-31 décembre. Guérit.

Cobaye 149 reçoit, le 20 janvier, 1 c. c. 5 émulsion de foie P. Mort atypique après dix jours. Spirochètes —.

Témoin 1 reçoit, le 20 janvier, 1 c. c. 5 émulsion de foie P. Mort en six jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.

Témoin 2 reçoit, le 20 janvier, 1 cent. cube émulsion de foie P. Mort en six jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.

Témoin 3 reçoit, le 20 janvier, 0 c. c. 5 émulsion de foie P. Mort en huit jours. Ictère. Hémorragies. Spirochètes +.

EXPÉRIENCE IX.

Cobaye 219 reçoit, le 23 avril, 2 cent. cubes culture P chauffée trois jours à 37°.

Cobaye 219 reçoit, le 27 avril, 2 cent. cubes culture P chauffée deux jours à 37°

Cobaye 219 reçoit, le 6 mai, 0 c. c. 5 culture P.

Cobaye 219 reçoit, le 16 mai, 1 cent. cube culture A. Reste en bon état.

Tous les témoins meurent de maladies intercurrentes excepté le gros Cobaye 313.

Cobaye 313 reçoit, le 16 mai, 0 c. c. 2 culture A. Ictère pendant quatre jours.

Mort après vingt-trois jours. Spirochètes dans les reins, foie négatif.

(Laboratoire de M. A. Pettit, à l'Institut Pasteur.)

ÉTUDES SUR LE STREPTOCOQUE GOURMEUX

(CINQUIÈME MÉMOIRE)

par M. BROcq-ROUSSEU, FORGEOFF et Ach. URBAIN.

Sérothérapie antigourmeuse.

HISTORIQUE.

Delvos, en 1898, paraît être le premier qui ait recherché l'action du sérum des animaux guéris de gourme (1). Il aurait obtenu des résultats favorables et enrayé la maladie dans plusieurs écuries.

Ces résultats, d'après Nocard et Leclainche, n'ont pas été confirmés (2). En 1902, Piorkowski (3) obtint un sérum antigourmeux actif en injectant au cheval des doses croissantes de cultures, en bouillon, de streptocoques gourmeux isolés du pus frais par ensemencement sur gélose. Ce sérum a paru avoir une action favorable sur l'évolution de la maladie.

En 1903, Nocard (4) signala à la Société centrale de médecine vétérinaire que Marmorek étendait la sphère d'action de son sérum, primitivement limitée à la lutte contre les streptocoques humains, en injectant à ses chevaux des cultures de streptocoques de la gourme. Les premiers essais heureux ne se généralisèrent pas.

La même année, Jelkmann (5) sérumisa 78 chevaux, qui restèrent par la suite indemnes de gourme, avec un produit

(1) DELVOS, Serum Anwendung bei Drüse. *Berliner tierärztliche Wochenschrift*, n° 2, 13 janvier 1898, p. 16.

(2) NOCARD et LECLAINCHE, *Les maladies microbiennes des animaux*, 3^e édition, 1905, 2, p. 313.

(3) PIORKOWSKI, Ueber Streptokokkensera. *Berl. klin. Woch.*, n° 48, 1902, p. 1125; *Berl. tierärz. Woch.*, n° 13, 11 décembre 1902, p. 803.

(4) NOCARD, Application du sérum antistreptococcique au traitement des affections gourmeuses. *Bull. de la Soc. centrale de méd. vét.*, 11 juin 1903, p. 309.

(5) JELKMANN, Ueber Gourmin.. *Berl. tier. Woch.* n° 2, 8 octobre 1903, p. 637.

préparé à l'Institut sérothérapique de Hœchst, appelé « gourmine », et dont le mode de préparation est resté secret.

Cette même année, Schnurer (1) rechercha si le sang des animaux guéris de gourme renferme des substances immunisantes, et si le sérum des animaux en état d'immunité active est doué de propriétés préventives. Il prit 13 souches, virulentes pour la souris, très peu virulentes pour le lapin et inactives pour le cobaye. Il se servit, comme producteurs de sérum, de l'âne et du lapin. Les conclusions de son travail sont que le sérum des chevaux guéris de la maladie naturelle ne donne aucune survie aux souris inoculées, et que les sérums expérimentaux, fournis par l'âne et le lapin, sont également inactifs.

En 1904, Piorkowski (2) publie des extraits de rapports démontrant les bons effets de son sérum. Il le titre par inoculation à la souris et par l'agglutination. Une race rendue très virulente par passage fournit un sérum tel que 0 c. c. 0005 protège une souris de 20 grammes contre deux doses mortelles.

En 1905, Ruppel (3) prépare un sérum avec lequel il protège la souris à la dose de 0 c. c. 0005 à 0 c. c. 00025 contre 10 à 100 doses mortelles de culture virulente.

La même année, Reimers (4) donne le résultat de ses recherches sur le sérum de Jess-Piorkowski. Sur 103 chevaux injectés préventivement, 63 ont pris la maladie entre dix jours et six semaines après l'injection. Sur 9 chevaux malades, le sérum n'a eu aucun effet.

Cependant, Jess (5) affirme à nouveau l'efficacité du sérum qu'il prépare. En 1905, également, Dassonville et de Wissocq communiquent, à la Société centrale de médecine vétérinaire, leur première tentative de sérothérapie contre la gourme (6).

(1) SCHNURER, Untersuchungen über die Immunität bei Drüse. *Zeil. f. thier. med.*, 7, nos 3 et 4, p. 286.

(2) PIORKOWSKI, Ueber Drüse Streptokokken serum Jess und Piorkowski. *Berl. thier. Woch.*, n° 24, 9 juin 1904, p. 425.

(3) RUPPEL, *Med. klinik.*, 1905

(4) REIMERS, Beobachtungen über die Behandlung und Prophylaxis der Drüse mittelst Drüsestreptokokkenserum. *Berl. tierärz., Woch.*, n° 13, 30 mars 1905, p. 229.

(5) JESS, Ueber Drüse Streptokokken serum. *Berl. tier. Woch.*, n° 14, 6 avril 1905, p. 242.

(6) DASSONVILLE et DE WISSOCQ, Première tentative de sérothérapie et de séro-vaccination anti-gourmeuses chez le cheval. *Bull. de la Soc. centr. de méd. vét.*, 25 mars 1905, p. 176; Sérum et vaccin antigourmeux. *Revue de path. comp.*, janvier 1907, p. 14.

Des inoculations successives de streptocoques gourmeux au cheval ayant montré que la résistance de l'animal augmentait après chaque injection, ces auteurs ont cherché si le sérum de ces animaux pouvait être utilisé contre le développement des affections d'origine gourmeuse. Ils recherchèrent son effet préventif; des animaux ayant reçu 30 cent. cubes de ce sérum peuvent être inoculés avec des cultures virulentes de streptocoque, à la dose de 4 à 5 cent. cubes, sans réactions appréciables; ils ne prennent pas la gourme ultérieurement. Des essais faits aux Etablissements de Suippes ont donné :

Sérumisés ayant pris la gourme : 28,57 p. 100.

Témoins ayant pris la gourme : 78,57 p. 100.

En 1906, Ludwig (1) constata que les passages du streptocoque en milieux artificiels atténuent sa virulence, et qu'on peut injecter ces germes atténués sans danger, dans le péritoine du lapin. Le sérum, tiré de ces lapins, prémunit à faible dose, 0 c. c. 01, contre une injection simultanée, dans le péritoine, de deux doses minima mortelles.

En 1907, Cerquetti (2) donna les résultats favorables qu'il avait obtenus avec un sérum préparé par Baruchello.

En 1908, Franz (3) indiqua les résultats favorables dus au sérum de Jess-Piorkowski, et il conclut que ce sérum, employé au début de l'infection, peut arrêter net la maladie; il influence aussi très favorablement le cours de celle-ci dans les cas graves. Enfin, il confère l'immunité pendant plusieurs années.

En 1909, Pricolo (4) immunisa des chevaux avec l'exsudat pleural de cobayes morts de streptococcie gourmeuse, et il constata que leur sérum, loin d'immuniser les animaux d'expérience contre l'inoculation d'épreuve, favorise, au contraire,

(1) LUDWIG, Experimentelle Untersuchungen über Drüse mit besonderer Berücksichtigung der Immunisierung von Kaninchen. *Monatshefte für praktische Thierheilkunde*, 17, 24 février 1906, p. 290.

(2) CERQUETTI, Sur l'action curative du sérum antigourmeux. *La Clinica veterinaria*, 20 avril 1907, p. 261.

(3) FRANZ, Die Drüse der Pferde und ihre Behandlung mit serum nach Jess-Piorkowski. *Deutsche Schutz und Heilserum Gesellschaft in Berl. Thierarztl. Woch.*, 8 octobre 1908, p. 637.

(4) PRICOLA, Sur une propriété d'un sérum préparé avec des exsudats streptococciques. *Centr. f. Bakt.*, 48, 10 octobre 1909, p. 109-114; Ricerche sperimentali sullo Streptococcus equi. *La Clinica veterinaria*, 32, p. 1, 96, 207, 279; 33, p. 89.

celle-ci. Il y aurait donc, dans ce sérum, des substances exerçant une action inhibitrice sur les anticorps. La même année, il publia le résultat de ses recherches sur le sérum qu'il prépare dans son laboratoire. Il appelle son sérum « normal », lorsqu'il protège, à la dose de 0,1 c. c., 250 grammes de lapin, contre dix doses mortelles. Son sérum n'est ni bactériolytique, ni agglutinant.

Au Congrès international vétérinaire de 1909, Pison (1) fait remarquer qu'un assez grand nombre d'expérimentateurs ont montré l'inefficacité de l'exaltation de la virulence, par passage du streptocoque sur le lapin. Ce streptocoque exalté, ramené sur des organismes supérieurs, se montre presque inoffensif; il faut donc admettre des adaptations, ce que nous avons démontré depuis. On se préoccupe davantage, dans la préparation d'un sérum antigourmeux, de l'obtention d'un sérum monovalent à grande puissance, que d'avoir un sérum polyvalent. Il conviendrait de prélever des germes dans des affections d'une gravité inusitée.

En 1910, le major général Smith (2) a essayé, dans la prévention de la gourme, 3 types de sérums dont il n'indique ni la nature, ni la provenance. Ces sérums ont donné quelques résultats au point de vue préventif, mais aucun au point de vue curatif.

En 1910, Desoubry (3) communique les résultats qu'il a obtenus avec le sérum de Dassonville et de Wissocq. Sur 650 sujets injectés, il n'a pas eu un seul cas de gourme. Breton, à la même séance, déclare que sur 200 observations il n'a pas eu un seul insuccès.

La même année, Marxer (4), utilisant la méthode qu'il a fait connaître avec Lévy et Blumenthal à propos de la tuberculose et de la morve, et qui consiste à faire agir sur les microbes

(1) PISON, La pathologie et la thérapie des streptococcies chez les animaux. IX^e Congrès international de méd. vét., 3, S. III, 1909, p. 3-4.

(2) SMITH, The prevention of strangles. *The veterinary Journal*, 17, New série, janvier 1910, p. 5.

(3) DESOUBRY, Prophylaxie de la gourme. *Bull. soc. centr. de méd. vét.*, 6 janvier 1910, p. 49.

(4) MARXER, Über Streptokokken immunisierung mit besonderer Berücksichtigung des Drüesestreptokokken. *Zeits. f. Infekt. der Hausihiere*, 8, p. 322; Zur kenntniss der Streptokokken und antistreptokokkenserums. *Berl. klin. Woch.*, 22 août 1911, p. 1583, 1585.

des solutions à 25 p. 100 de galactose ou d'urée, a immunisé des animaux. Selon lui, les streptocoques ayant séjourné quatre jours à 37° dans une de ces solutions conviennent beaucoup mieux que les microbes tués pour l'immunisation des lapins. L'immunité obtenue contre un streptocoque donné est aussi solide vis-à-vis des autres streptocoques. Ainsi, un sérum obtenu sans streptocoque gourmeux protège, néanmoins, contre le streptocoque. Ce même auteur confirme ce qui avait été dit, à savoir que le sérum des animaux guéris de gourme n'a aucun pouvoir protecteur. Il a vu aussi qu'un sérum préparé avec un streptocoque de la gourme protégeait contre un streptocoque humain.

En 1911, Desoubry (1) confirma les bons résultats qu'il avait déjà obtenus avec le sérum de Dassonville et de Wissocq.

En 1912, Holterbach (2) prépara, à la fabrique de Hoechst, un sérum antigourmeux qu'il nomma « *esuridin* », et qui est préventif et curatif.

Au cours d'un article sur la spécificité du streptocoque de la gourme, Bemelmans (3) note que les résultats obtenus par la sérumisation des chevaux de remonte sont excellents; mais que lorsque les effets ne sont pas favorables, il y a lieu d'attribuer cela à la présence de staphylocoques très virulents, vivant à côté du streptocoque de la gourme.

En 1913, Carpano (4) donne la technique de préparation et le mode d'emploi d'un sérum polyvalent produit par le laboratoire vétérinaire militaire de Rome. Ce sérum est obtenu en hyperimmunisant des chevaux avec des cultures exaltées par passages, et avec des races d'origines diverses n'ayant jamais fait de passages par un animal. Les chevaux immunisés arrivent à supporter 500 cent. cubes de cultures virulentes par voie veineuse. Le sérum est utilisé comme préventif et curatif:

(1) DESOUBRY, A propos de la sérothérapie antigourmeuse. *Revue gén. de méd. vét.*, n° 18, p. 392.

(2) HOLTERBACH, Die Bekämpfung der Drüse. *Osterreichische Woch. für Tierheilkunde*, n° 21, 23 mai 1912, p. 203; 30 mai, n° 22, p. 216.

(3) BEMELMANS, La spécificité des streptocoques de la gourme. *Centr. f. Bakt.*, 1913, 70, p. 48.

(4) CARPANO, Sulla natura e sull'uso del siero antistreptococcio preparato nel Laboratorio batteriologico veterinario militare. *Il moderno Zooiatro*, 1913, *Ann. d'Igiene sperim.*, 23, 1913, p. 307.

il donne de bons résultats à condition de multiplier les injections.

La même année, Bertolotti (1) donne les résultats favorables qu'il a obtenus avec un sérum préparé à l'Institut sérothérapique de Milan.

En 1918, Schiphorst (2) considère le streptocoque comme l'agent spécifique de la maladie. Le sérum préparé avec des cultures tuées, est inactif; par contre, si l'on utilise des cultures virulentes, on est sûr d'obtenir un sérum doué d'un pouvoir curatif élevé.

En 1920, Carpano (3) constate que le pouvoir bactériotropique du sérum antistreptococcique, préparé avec des microbes tués, est égal à celui préparé avec des germes vivants. Le sérum obtenu avec des microbes vivants a une activité anti-infectieuse supérieure à celui du sérum obtenu avec des microbes morts. Malgré les inconvénients résultant de l'emploi de microbes vivants, on doit préférer ce procédé, en raison de l'activité plus grande du sérum.

En 1923, Adersen (4) communiqua ses recherches sur le sérum antigourmeux qu'il prépare. Il a titré huit sérums différents; il injecte le sérum dans la veine du lapin, et vingt-quatre heures plus tard, il fait une injection virulente intrapéritonéale. Un de ses meilleurs sérums donne dix-huit survies sur vingt-six animaux inoculés.

. . .

La majorité des streptocoques gourmeux issus de l'organisme étant en général peu pathogènes pour les petits animaux de laboratoire, presque tous les auteurs qui se sont occupés de la sérothérapie de la gourme ont été amenés à utiliser comme

(1) BERLOTTI, Contributo alla sieroterapia dell'adenite equina. *La Clinica veterinaria*, 30 mars 1913, p. 271.

(2) SCHIPHORST, Die Bekämpfung der Dürse mittelst Serum. *Centr. f. Bakt.*, 81, 31 mai 1918, p. 289-317.

(3) CARPANO, Sull'azione antiinfettiva e sul potere batteriotropo dei sieri antistreptococchi preparati con germi viventi ed uccisi. *Ann. d'lg. sper.*, 30, 1920.

(4) ADERSEN, Experimentelle Untersuchungen über die Heilwirkung des Drüsen serums. *Maanedss. f. Dyrloeger*, 34; *Comptes rendus de la Soc. danoise de Biologie*, 15 juin 1922, p. 470.

antigènes des streptocoques gourmeux dont la virulence était exaltée par passages chez la souris, le cobaye ou le lapin.

Ils pensaient pouvoir augmenter, par ce moyen, la valeur de leur sérum, dans ses applications cliniques, et trouver un procédé de titrage sur les animaux de laboratoire.

En réalité, en procédant ainsi ils n'avaient plus affaire qu'à un streptocoque considérablement modifié, et transformé en streptocoque de passage, ainsi que l'a montré Besredka (1). On s'explique ainsi que le sérum obtenu ait été actif au laboratoire vis-à-vis de la souche utilisée, pour protéger les animaux, mais que, dans la pratique, les résultats aient été plus inconstants.

Dans nos études sur le streptocoque gourmeux, nous avons confirmé que les passages de ce microbe chez les différents animaux de laboratoire le transformaient en lui faisant perdre notamment la propriété de fixer l'alexine en présence des anticorps d'un sérum antigourmeux (2).

Nous avons donc essayé de préparer un sérum anti, en utilisant comme antigènes des souches de streptocoques sortant directement du cheval, et, parmi celles-ci, les rares souches virulentes pour le cobaye. Nous avons obtenu un sérum qui a protégé les animaux de laboratoire non seulement contre les souches virulentes injectées au cheval, mais aussi contre les autres souches n'ayant pas servi aux immunisations (3); et qui paraît avoir donné d'heureux résultats dans la pratique.

A. — Immunisation au moyen des germes tués par l'alcool-éther.

L'immunisation du cheval contre le streptocoque gourmeux est rendue difficile du fait que l'on s'adresse à un animal particulièrement sensible à ce microbe. Les injections de ce streptocoque virulent, par quelque voie qu'elles soient faites, déterminent toujours, chez le cheval, un des symptômes ou

(1) BESREDKA. *Ces Annales*, 1904, p. 362.

(2) BROCC-ROUSSEU FORGEOT et URBAIN. *Ces Annales*, 1923, p. 322.

(3) BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN, Sérothérapie contre la gourme du cheval. *C. R. Acad. des Sciences*, 29 octobre 1923, p. 843.

une des complications de la gourme, à un degré variable de gravité.

Pour éviter ces accidents, nous avons pensé à utiliser comme antigène, au début de l'immunisation tout au moins, des microbes traités par l'alcool-éther.

L'emploi de microbes ainsi traités paraît avoir été fait d'abord par Nicolle, qui s'en servit pour vacciner des cobayes contre la morve (1). Les premiers qui s'en soient servis comme antigène, pour produire un sérum, sont Leclainche et Vallée (2) pour la production de leur sérum polyvalent. Dans leur travail, Nicolle, Frasey, Debains et Nicolas (3) exposent les raisons qui leur font préférer les injections de microbes tués par cette méthode: « *on injecte des doses bien définies d'un produit toujours identique et incapable de s'accroître in vivo ; rien ne vient donc compliquer l'immunisation, ni rendre le sérum éventuellement nuisible.* » Ils ont ainsi obtenu des sérums actifs contre les bacilles typhiques et paratyphiques, le méningocoque, le vibrion cholérique et le *B. melitensis*.

Cotoni, Truche et M^{lle} Raphael (4) ont aussi obtenu par cette méthode un sérum antipneumococcique.

La première application de ce procédé a été faite par l'un de nous (5), en ce qui concerne le streptocoque de la gourme.

Les germes tués par l'alcool-éther conservent intact leur pouvoir toxique, ce qui donne lieu parfois à des accidents mortels (typhique, paratyphique, méningocoque). Nous n'avons jamais observé pareils accidents avec le streptocoque.

Nous n'avons gardé comme antigènes que les streptocoques gourmeux qui, au sortir de l'organisme, tuaient le cobaye en injection sous-cutanée. Nous avons utilisé, comme voies d'introduction, la voie sous-cutanée, la voie trachéale et la voie intraveineuse.

(1) M. NICOLLE, Études sur la morve expérimentale du cobaye. Ces *Annales*, août 1906, p. 625-734 : avril 1907, p. 281.

(2) LECLAINCHE et VALLÉE, Sur le traitement spécifique des plaies. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 154, mars 1912, p. 636.

(3) NICOLLE, FRASEY, DEBAINS et NICOLAS, Recherches sur la préparation des sérums antimicrobiens et antitoxiques chez le cheval. Ces *Annales*, 34, n° 5, mai 1920, p. 285.

(4) COTONI, TRUCHE et M^{lle} RAPHAEL, *Pneumocoques et affections pneumococciques*, 1922.

(5) BROCC-ROUSSEU, Injections, au cheval, de streptocoque équin, traité par l'alcool éther. *C. R. Soc. de Biologie*, n° 9, mars 1921, p. 445.

1. VOIE SOUS-CUTANÉE.

Le cheval Chalais reçoit sous la peau de l'encolure quatre injections d'une émulsion de streptocoques alcool-éther aux doses suivantes : 1 centigramme, 1 centigr. 5, 2 et 5 centigrammes, à huit jours d'intervalle chacune.

L'émulsion est préparée de la façon suivante : on prend la dose de microbes secs qu'on met dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour faire l'injection ; on les broie, on porte à l'ébullition deux minutes, on laisse refroidir et on injecte lorsque la température est d'environ 37°.

La réaction locale s'est manifestée par un œdème de la grosseur d'un œuf de poule, sensible, qui s'est résorbé en huit jours ; il n'y a pas eu de réaction générale et la température n'a pas dépassé 38°6.

Après la troisième injection, la recherche des anticorps dans le sérum de ce cheval a été positive et nous a donné, suivant la numération de Calmette et Massol, 150 unités. Après deux injections successives de 5 centigrammes, le taux a monté à 1.000 unités et a atteint 1.500, après la septième injection.

A la huitième injection, un abcès aseptique se forma et le taux des anticorps tomba à 50 unités.

On continua la série des injections avec un autre antigène pendant deux mois et le taux des anticorps varia de 100 à 500 unités. Un autre abcès s'étant déclaré, nous abandonnâmes les injections par cette voie, puisque, à chaque abcès, le taux des anticorps descend dans des proportions considérables.

Cette diminution peut être expliquée par une fixation de l'antigène circulant sur les leucocytes des abcès aseptiques produits. Netter et Cesari (1) ont mis en évidence dans le pus d'un abcès de fixation provoqué au cours d'une méningite à pneumocoques une précipito-réaction avec un sérum anti-pneumococcique. Cette précipitation prouvait bien la présence

(1) NETTER et CESARI, Méningite suppurée à pneumocoques, consécutive à une otite compliquée de paralysie faciale ; guérison après abcès de fixation. Présence des antigènes du pneumocoque type II dans le pus de l'abcès. *Bull. et Mémoires de la Soc. méd. des Hôpitaux de Paris*, n° 18, 31 mars 1923, p. 763.

d'un antigène pneumococcique dans le liquide autolysé de cet abcès.

2. VOIE TRACHÉALE.

Besredka a utilisé la voie trachéale dans ses recherches sur l'anaphylaxie et a constaté qu'on pouvait, par cette voie, injecter aux lapins et aux cobayes des quantités beaucoup plus considérables de sérum sans que les animaux en soient plus incommodés que par la voie veineuse ou péritonéale. Le choc anaphylactique peut être déclenché par cette voie, comme il l'est par une injection dans la veine ou le cerveau (1). Il a constaté aussi que, lorsqu'il s'agit de toxines ou de poisons solubles, leur action est la même et s'exerce dans le même temps, qu'ils soient administrés par la voie veineuse ou par la voie trachéale (2). Il a pu faire supporter à un animal par la voie trachéale une dose de virus paratyphique cinquante fois supérieure à celle que comporte sa résistance normale; par contre, une injection préalable dans la trachée de 0 c. c. 5 de bile diluée au 1/20^e diminue la résistance de la muqueuse pulmonaire. La production des anticorps est aussi augmentée dans de notables proportions lorsqu'on injecte l'antigène tuberculeux à l'œuf.

Pfenninger a confirmé ces faits et a constaté en particulier que des lapins immunisés par la voie respiratoire avec des doses croissantes de paratyphiques B produisaient des agglutinines en abondance (3).

R. d'Aunoy a fait des constatations analogues avec la fièvre typhoïde et la dysenterie; le taux des agglutinines obtenu par voie trachéale est supérieur à celui obtenu par voie veineuse (4).

Nous basant sur ces travaux, nous avons essayé ce que donnait la voie trachéale au point de vue de l'immunisation contre le streptocoque gourmeux.

(1) BESREDKA, De l'action des sérums par la voie respiratoire. Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 31.

(2) BESREDKA, Infection et vaccination par voie trachéale. Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 362.

(3) W. PFENNINGER, De l'importance de la voie respiratoire dans la production des anticorps. Ces *Annales*, **35**, 1921, p. 237.

(4) R. D'AUNOY, Antibody production after intratracheal injection of antigen. *Journ. of Inf. diseases*, 1922, **30**, n° 4, p. 347-356.

Le cheval Housse reçoit dans la trachée des émulsions de cultures de vingt-quatre heures sur gélose, de streptocoques, à raison de 4 c. c. d'eau physiologique par tube de culture. Il reçoit ainsi 1, 2, 3, 10, 15 cent. cubes d'émulsion, les streptocoques étant tués par un chauffage de dix minutes à 90°.

Il n'a présenté aucune réaction générale, ni thermique, et la recherche d'une sensibilisatrice vis-à-vis de l'antigène servant à l'immunisation a toujours été négative.

On lui injecta ensuite dans la trachée des émulsions de microbes tués par l'alcool-éther à raison de 1, 2, 3, 4 centigrammes en quatre jours successifs le premier mois; puis, les autres mois, 2, 4, 8, 16 centigrammes d'un mélange de plusieurs souches. On continua ces doses pendant un an.

Dès la première série d'injections de germes alcool-éther, le sérum de ce cheval a montré qu'il contenait une sensibilisatrice déviant le complément en présence d'un antigène streptocoque gourmeux; le taux des anticorps était peu élevé, puisqu'il se chiffrait par 15 unités; mais, les mois suivants, il montait jusqu'à 2.000 et pendant toute la durée de l'expérience se maintint entre 500 et 1.000 unités.

A la suite de ces injections trachéales, nous n'avons jamais noté de réaction générale; la température seule monte aux environs de 39°.

Le sérum de ce cheval n'ayant protégé qu'un cobaye sur deux contre une dose mortelle de streptocoques gourmeux, cet animal fut ensuite soumis aux injections intraveineuses.

3. VOIE INTRAVEINEUSE.

Les injections sont faites dans la veine jugulaire. Pour éviter les accidents d'hypersensibilité, l'antigène est émulsionné dans 150 cent. cubes d'eau physiologique tiède et injecté lentement. Nos essais ont été faits, au début, avec un seul antigène, puis avec un mélange de souches différentes.

La première série d'injections est faite pendant dix jours successifs, le cheval recevant des doses d'antigène variant de 0,25 à 1 centigramme par jour. On continue en injectant tous les trente jours, et pendant quatre jours consécutifs, des quantités

croissantes d'antigène, jusqu'à 5 centigrammes. On saigne l'animal onze jours après la dernière injection.

Au cours de la première série d'injections, le cheval présente parfois des troubles analogues à ceux qui ont été déjà constatés pendant les injections de germes alcool-éther, autres que le streptocoque. On note, quelques minutes après l'injection, une accélération des mouvements respiratoires, allant jusqu'à la dyspnée; l'animal a des frissons, s'agite, gratte le sol, et se couche, parfois, en décubitus latéral complet.

La réaction thermique est parfois très élevée, ainsi qu'on peut le voir d'après le relevé suivant des températures du cheval Infutable :

DATE de l'injection	QUANTITÉ d'antigène injectée en centigrammes	TEMPÉRATURE maximum en degrés
<i> Première série :</i>		
3 décembre 1920	1	40
4 —	1	40,9
5 —	0,50	40,5
6 —	0,50	40,9
7 —	0,25	39,6
8 —	0,25	40
9 —	0,25	40,1
10 —	0,25	39,9
11 —	0,50	40,4
12 —	1	40,7
<i> Deuxième série :</i>		
12 janvier 1921	2	39,5
13 —	3	40,4
14 —	4	40,5
15 —	5	40,5
<i> Troisième série :</i>		
15 février 1921	2	37,9
16 —	3	39
17 —	2	39,1
18 —	2	38,1
19 —	4	38,8

Les températures de la troisième série sont plus basses que celles des deux autres; l'animal acquiert une certaine immunité vis-à-vis de l'antigène employé. On voit aussi que la quantité de germes ne paraît pas avoir une grosse influence, puisque 3,

4 ou 5 centigrammes ne donnent pas une réaction plus forte que 0,25 centigrammes.

La température s'élève cependant si l'on change l'antigène ; par exemple, avec ce cheval, l'antigène 376 fait monter la température à 40°6, et avec le mélange Orléans-Carpano, elle monte à 40°1.

Certains chevaux ne présentent que des réactions insignifiantes ; ils paraissent indifférents à ces injections ; c'est tout au plus si la température monte à 38°.

RECHERCHE DES ANTICORPS.

a) SENSIBILISATRICE. — Nous avons recherché systématiquement, dans le sérum des animaux ainsi immunisés, une sensibilisatrice spécifique, fixant l'alexine en présence d'un antigène streptocoque gourmeux. Les résultats les plus démonstratifs ont été obtenus avec le sérum du cheval Infutable :

DATE des injections	TAUX des anticorps
3 décembre 1920.	50 unités
15 janvier 1921	50 —
15 février 1921	300 —
15 mars 1921	2.000 —
15 avril 1921	4.500 —
16 mai 1921.	4.500 —
2 juin 1921.	20.000 —

Ce taux très élevé des anticorps s'est maintenu pendant plus d'un an, puis, sans cause apparente, il est tombé à 4.500. Le cheval a été laissé au repos pendant trois mois, puis soumis à de nouvelles injections de microbes tués par l'alcool-éther ; le taux des anticorps s'est relevé de suite à 4.500. Cet animal étant mort au cours des immunisations ultérieures, on n'a pu poursuivre plus loin la recherche de la sensibilisatrice.

Avec d'autres animaux, nous avons obtenu : chez le cheval Chalais, un taux maximum de 4.500 unités d'anticorps, qui s'est maintenu à ce chiffre pendant près de deux années ; avec les juments Margot et Coquette, nous avons atteint 500 unités à la quatrième série d'injections.

b) PRÉCIPITINES. — Nous ne reviendrons pas sur cette question que nous avons déjà traitée précédemment (1).

c) AGGLUTININES. — L'agglutinabilité des cultures de streptocoques gourmeux par le sérum des chevaux immunisés contre la gourme a fait l'objet de quelques travaux antérieurs.

Piorkowski (2) a vu que ce sérum agglutine le streptocoque gourmeux à 1 p. 100; le streptocoque pyogène de l'homme à 1 p. 25; mais qu'il était sans action sur le streptocoque humain de l'angine.

Angelici (3) a fait une longue étude sur ce pouvoir agglutinant; voici ce qu'il a obtenu: avec le germe qui a servi à l'immunisation, il enregistre, après cinq ou vingt-quatre heures d'étuve, une agglutination complète à 1 pour 15.000, et incomplète à 1 p. 20.000. Avec deux autres streptocoques gourmeux, et un streptocoque isolé d'une pneumonie, les agglutinations furent du même ordre.

Avec un streptocoque provenant du poumon d'un cheval atteint de typhoïde, il n'y eut pas d'agglutination. Avec un streptocoque isolé d'une lymphangite épizootique, l'agglutination était nette à 1 p. 100, et négative à 1 p. 5.000. Le streptocoque des fèces du cheval n'était pas agglutiné à 1 p. 1.000; et avec le streptocoque pyogène de l'homme, la réaction était incomplète à ce taux.

Pricolo (4) n'a jamais pu déceler d'agglutinines spécifiques dans le sérum des chevaux immunisés contre le streptocoque de la gourme.

Nos recherches ont porté sur le sérum de chevaux immunisés soit par la voie veineuse, soit par la voie trachéale. La technique que nous avons utilisée a été celle de Nicolle, Debains, Frasey et Nicolas (5). Le streptocoque cultivé sur gélose Martin a été employé après douze heures de culture au plus; il est ensuite émulsionné à raison de 1 centigramme par 20 cent. cubes d'eau physiologique à 9 p. 1.000; et, pour que

(1) BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN. Ces *Annales*, décembre 1924, p. 1044.

(2) PIORKOWSKI. *Loc. cit.*

(3) ANGELICI G. Contributo alle conoscenze sullo streptococco dell'adenite equina. *La Clinica veterinaria*, An. XXVII, n° 36, 1904, p. 213, 225, 237.

(4) PRICOLA, *loc. cit.*

(5) NICOLLE, DEBAINS, FRASEY et NICOLAS. *Loc. cit.*

l'émulsion soit homogène, on secoue la dilution dans un flacon contenant des perles de verre. On répartit ensuite dans les tubes, et ceux-ci, bouchés à l'ouate, sont agités pendant quelques minutes en les inclinant et les redressant; on les abandonne cinq à six heures à la température du laboratoire.

Les sérums ont toujours été éprouvés, dès le lendemain de la saignée, vis-à-vis de trois souches de streptocoques gourmeux, de deux streptocoques humains, et de deux streptocoques d'autres animaux. Voici les résultats obtenus :

Sérum Housse (immunisation par la voie veineuse).

Streptocoque gourmeux, souche Serpette, ne s'agglutine pas à 1 p. 25.	
Streptocoque gourmeux, souche Terrible, agglutination complète à 1 p. 800.	
Streptocoque gourmeux, souche Carpano, agglutination à 1 p. 50.	
Streptocoque vache	} ne s'agglutinent pas à 1 p. 25.
Streptocoque porc	
Streptocoque humain, sein	
Streptocoque humain, pneumonie	

Sérum Coquette (immunisation par la voie veineuse).

Streptocoque gourmeux, souche Serpette, ne s'agglutine pas à 1 p. 25.	
Streptocoque gourmeux, souche Terrible, s'agglutine à 1 p. 500.	
Streptocoque gourmeux, souche Carpano, s'agglutine à 1 p. 25.	
Streptocoque vache	} ne s'agglutinent pas à 1 p. 25.
Streptocoque porc	
Streptocoque humain, sein	
Streptocoque humain, pneumonie	

Sérum Locifoque (immunisation par la voie trachéale).

Streptocoque gourmeux, souche Serpette, ne s'agglutine pas.	
Streptocoque gourmeux, souche Terrible, s'agglutine à 1 p. 250.	
Streptocoque gourmeux, souche Carpano, ne s'agglutine pas.	
Streptocoque vache	} ne s'agglutinent pas.
Streptocoque porc	
Streptocoque humain, sein	
Streptocoque humain, pneumonie	

Les sept souches examinées n'ont pas été agglutinées par deux sérums équin normaux.

Il en résulte donc que la teneur en agglutinines des sérums antigourmeux est peu élevée, et que l'agglutinabilité du streptocoque gourmeux est très variable. Les agglutinines de ces sérums sont cependant spécifiques, puisqu'elles ne sont mises en évidence que par des streptocoques du type gourmeux.

TITRAGE DU SÉRUM. — Le pouvoir protecteur du sérum a été essayé sur la souris et sur le cobaye.

a) *Souris*. — Nous n'avons pas toujours, surtout au début, obtenu une protection certaine. Voici quelques exemples de protection, avec le sérum du cheval Infutable :

1° Après la quatrième saignée ; taux des anticorps, 2.000 :

Sous la peau, après une demi-heure de contact, mélange de 0 c. c. 5 de sérum et de 1/1.000 de cent. cube de culture de streptocoque R. F. de vingt-quatre heures, résiste.

Sous la peau 0 c. c. 5 de sérum et trois heures après 1/1.000 de cent. cube de culture R. F. de vingt-quatre heures, résiste.

Sous la peau, 1/1.000 de cent. cube de culture R. F., et trois heures après 0 c. c. 5 de sérum, résiste.

Sous la peau, 0 c. c. 5 de sérum normal et 1/1.000 de cent. cube de culture R. F., morte en cinq jours.

Témoin, sous la peau, 1/1.000 de cent. cube de culture R. F., morte en sept jours.

2° Après la cinquième saignée : taux des anticorps, 1.500 :

Sérum la veille, 1/1.000 de cent. cube de culture R. F., résiste.

Mélange 0 c. c. 5 et 1/1.000 de cent. cube de culture R. F. après une demi-heure de contact, résiste.

1/1.000 de cent. cube et trois heures après 0 c. c. 5 de sérum, résiste.

Témoin, sérum normal 0 c. c. 5 et 1/1.000 de cent. cube de culture, résiste, mais présente une escarre.

3° Après la cinquième saignée : taux des anticorps, 1.500 :

Mêmes doses, même culture, par mélange, résiste.

Sérum avant, culture trois heures après, résiste.

Virus, puis sérum trois heures après, résiste.

Témoin sérum normal, morte en cinq jours.

Témoin sans sérum, morte en sept jours.

b) *Cobaye*. — Nous donnerons les essais faits avec le sérum des juments Margot et Coquette.

Sérum Margot.

Première saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 440 grammes, reçoit sous la peau 2 cent. cubes de sérum, et vingt-quatre heures après 4 cent. cubes souche Terrible, résiste.

Témoin, 510 grammes, 4 cent. cubes souche Terrible, meurt en dix-huit heures.

Deuxième saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 460 grammes, reçoit sous la peau 2 cent. cubes de sérum et vingt-quatre heures après 4 cent. cubes souche Terrible, meurt en deux jours.
Témoin, 510 grammes, 4 cent. cubes de culture, meurt en douze heures.

Troisième saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 520 grammes, reçoit sous la peau 2 cent. cubes de sérum et vingt-quatre heures après, 4 cent. cubes souche Uranie, meurt en deux jours.
Cobaye, 515 grammes, reçoit sous la peau 2 cent. cubes de sérum et vingt-quatre heures après, 4 cent. cubes souche Uranie, meurt en huit jours.
Témoin, 550 grammes, 4 cent. cubes culture Uranie, meurt en vingt-quatre heures.

Quatrième saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 430 grammes, reçoit sous la peau 2 cent. cubes de sérum et vingt-quatre heures après, 4 cent. cubes souche Uranie, résiste.
Témoin, 485 grammes, 4 cent. cubes même souche, meurt en vingt-quatre heures.

*Sérum Coquette (mêmes conditions que ci-dessus).**Première saignée : taux des anticorps, 250 unités.*

Cobaye, 440 grammes, sérum et souche Terrible, meurt en vingt-quatre heures.
Témoin, 510 grammes, meurt en douze heures.

Deuxième saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 500 grammes, sérum et souche Terrible, résiste
Témoin, 510 grammes, meurt en douze heures.

Troisième saignée : taux des anticorps, 220 unités.

Cobaye, 535 grammes, sérum et souche Uranie, meurt en trois jours.
Cobaye, 525 grammes, sérum et souche Uranie, meurt en dix jours.
Témoin, 550 grammes, meurt en vingt-quatre heures.

Quatrième saignée : taux des anticorps, 250 unités.

Cobaye, 355 grammes, sérum et souche Uranie, meurt en deux jours.
Cobaye, 390 grammes, sérum et souche Uranie, meurt en quatre jours.
Cobaye témoin, 485 grammes, meurt en vingt-quatre heures.

Le sérum des chevaux inoculés seulement avec des microbes tués par l'alcool-éther a donc certaines propriétés immunisantes, puisqu'il protège définitivement 2 cobayes sur 10, contre une ou deux doses mortelles; et qu'on obtient avec lui une survie variant de deux à trois jours. Dans quelques cas, il protège aussi la souris contre plusieurs doses mortelles. Dans la pratique, il a donné des résultats favorables dans le traitement des pneumonies gourmeuses.

Nous ferons remarquer qu'il ne semble y avoir aucun rapport entre la richesse du sérum en anticorps et son pouvoir protecteur. Avec le sérum du cheval Infutable provenant de la saignée du 4 avril 1921, dont le taux des anticorps était de 2.000 unités, nous avons protégé la souris contre plusieurs doses mortelles de streptocoque, alors que le sérum provenant de la saignée du 8 mai 1923, qui titrait 25.000 unités d'anticorps, ne protégeait pas les animaux contre les mêmes doses.

D'autre part, les sérums de Margot et de Coquette, qui protègent dans quelques cas le cobaye contre deux doses mortelles de streptocoque, ne titraient que 250 unités d'anticorps.

B. — Immunisation au moyen de germes tués par l'alcool-éther, et de germes vivants.

Nos essais de protection des animaux, par le sérum de chevaux recevant uniquement des germes tués par l'alcool-éther, ne nous ayant pas donné complète satisfaction, quoiqu'ils fussent encourageants, nous avons pensé pouvoir obtenir un sérum plus actif, en associant à l'antigène mort un antigène vivant, constitué par des cultures sur gélose de nos streptocoques les plus virulents pour les animaux de laboratoire.

Nous opérons d'abord, comme nous venons de l'exposer, uniquement avec des microbes tués par l'alcool-éther; puis, au bout de trois à quatre mois, lorsque les chevaux paraissent être suffisamment immunisés contre l'antigène employé, c'est-à-dire lorsque les réactions thermique et générale se sont atténuées, et que le taux des anticorps de leur sérum est élevé, on injecte, par voie veineuse, des microbes d'abord atténués par la chaleur, puis de moins en moins atténués, et enfin des

cultures vivantes très virulentes; ces injections alternant avec des injections du premier antigène alcool-éther.

A titre d'exemple, voici le protocole d'une série d'injections pratiquées sur le cheval Chalais :

- 1^{er} mai, injection intracaveuse de 1 centigramme de microbes alcool-éther, mélange des souches Carpano et Orléans : température maximum 38°5.
- 2 mai, injection intraveineuse de 1/2 tube de culture Carpano, sur gélose, chauffée quatre minutes à 65°, 38°4.
- 3 mai, injection intraveineuse de 2 centigr. de microbes alcool-éther, mélange Carpano-Orléans, 38°7.
- 4 mai, injection de 1 tube de culture de vingt-quatre heures, comme ci-dessus, chauffée trois minutes à 65°, 40°1.

Les mois suivants, il a été procédé de la même façon, en chauffant de moins en moins les microbes, jusqu'à ce que l'on injecte des microbes vivants. A ce moment, nous avons pu injecter, sans risque, la culture entière de vingt-quatre heures d'une boîte de Roux.

Cette méthode d'immunisation mixte a donné lieu aux mêmes réactions générales et thermiques que celles enregistrées avec les microbes alcool-éther. Le taux des anticorps a été moins élevé que par la méthode précédente : il n'a jamais dépassé 1.500 unités.

Le pouvoir protecteur du sérum ainsi obtenu a été mesuré sur le cobaye et la souris. Voici deux exemples de protection :

Souris.

- 5 souris reçoivent sous la peau 1 cent. cube de sérum ; le lendemain 1/10.000 de cent. cube d'une culture qui tue au cent millième de cent. cube ; elles résistent.
- 3 témoins sans sérum, 2 meurent en un jour et demi ; 1 meurt en cinq jours.
- 2 témoins ayant reçu du sérum normal meurent en cinq jours.

Cobaye.

- 10 cobayes reçoivent une culture de streptocoque aux doses suivantes :
 - 1 cobaye reçoit 1 cent. cube, résiste, dose non mortelle.
 - 1 cobaye reçoit 1 c. c. 5, résiste, dose non mortelle.
 - 1 cobaye reçoit 2 cent. cubes, meurt en vingt heures.
 - 7 cobayes reçoivent 2 c. c. 5, meurent en douze heures.
- 10 cobayes témoins reçoivent du sérum normal et le lendemain 2 cent. cubes d'une culture qui tue, à cette dose, le cobaye en dix-huit heures :
 - 9 meurent en dix-huit heures.
 - 1 meurt en vingt heures.

10 cobayes reçoivent 2 cent. cubes de sérum antigourmeux et le lendemain, les doses suivantes de la même culture que ci-dessus :

3 cobayes reçoivent 2 cent. cubes.

3 cobayes reçoivent 3 cent. cubes.

2 cobayes reçoivent 4 cent. cubes.

2 cobayes reçoivent 5 cent. cubes.

Tous les cobayes résistent, sauf un qui meurt après une survie de huit jours.

On voit donc que le sérum employé est actif contre des doses allant jusque mille fois la dose mortelle pour la souris, et deux fois et demie pour le cobaye. Il paraît donc bien établi que nous avons obtenu un sérum véritablement actif contre le streptocoque gourmeux.

Nous ferons remarquer que le microbe qui a servi à inoculer les animaux, comme souche mortelle, n'est jamais entré dans la composition de l'antigène vivant ni mort que nous injectons à nos chevaux ; il n'avait pas non plus fait de passage par la souris ni le cobaye.

ESSAI DU SÉRUM DANS LA PRATIQUE.

Les envois de sérum qui ont été faits aux différentes annexes ou dépôts de remonte, où la gourme sévit en permanence, ont permis d'expérimenter sur un nombre d'animaux assez grand pour que les conclusions des vétérinaires de ces établissements soient tenues comme représentant une opinion aussi proche de la vérité qu'il soit possible de l'atteindre, dans les conditions de la pratique.

Nous estimons, qu'une expérimentation ainsi poursuivie pendant plusieurs années, avec les résultats statistiques qui résulteront de l'emploi régulier du sérum, nous donneront une certitude scientifique au même titre qu'une seule expérience portant sur un nombre déterminé de chevaux, dans des conditions déterminées, précisées à l'avance.

Nous avons reçu de nombreux documents concernant les résultats obtenus. Ces documents étant d'ordre militaire, nous ne pouvons en faire état pour le moment ; mais nous pouvons donner les conclusions de deux travaux qui ont été publiés sur la question.

Le vétérinaire-major Paris, du dépôt de remonte de Saint-Lô, a traité systématiquement, depuis le mois de décembre 1922,

ses gourmeux les plus sévèrement atteints, par le sérum, en injections veineuses. Après avoir étudié un certain nombre de cas cliniques, il conclut de la façon suivante (1) :

« Par l'étude de ces cas cliniques, il est facile de constater l'action curative spécifique du sérum antigourmeux.

1° *Action antithermique* : Après la première ou la deuxième injection, régulièrement, la température baisse, et, si parfois, il y a réaction, elle n'est que fugace et n'entraîne pas d'aggravation. Toutes les courbes thermiques sont unanimes à enregistrer cette action. Elle est d'autant plus marquée que la maladie est prise plus à son début, alors qu'aucune localisation à un organe important ne s'est encore manifestée. Cette action antithermique est l'expression même de l'activité antitoxique de ce sérum, presque concomitante avec l'arrêt puis la diminution progressive du processus morbide.

2° *Action antipurulente* : A l'exception d'un seul, aucun des cas traités par le sérum antigourmeux n'a évolué vers la suppuration. Malgré la gravité de la plupart d'entre eux, nous n'avons jamais constaté d'abcédation des ganglions lymphatiques, ce qui est, en général, une des complications classiques de la gourme.

Comme conséquence, les malades traités par le sérum antigourmeux, ayant échappé à la suppuration, sont restés dans un état d'entretien suffisant, et, dès leur convalescence, ont repris rapidement de l'embonpoint. Aucun traînard ou pilier d'infirmerie pour misère physiologique ou suppuration tardive et presque toujours ignorée des grandes cavités splanchniques, complication fréquente et trop souvent mortelle de cette affection.

3° *Action abortive* : Dans les cas de gourme, pris tout à fait à leur début, l'action du sérum est nettement abortive, et réduit de moitié la durée d'indisponibilité. »

Le vétérinaire-major Millet, de la garde républicaine, a traité par le sérum tous ses malades, au cours d'une épizootie de pneumonie gourmeuse (2).

(1) PARIS, Contribution à l'étude du traitement de la gourme. *Revue vétérinaire militaire*, 7, 1923, p. 326-348.

(2) MILLET, Epizootie de pneumonie gourmeuse. Traitement par le sérum antigourmeux. *Revue vétérinaire militaire*, 8, 1924, p. 74-83.

Nous considérons cette relation comme particulièrement démonstrative parce que nous avons pu faire la déviation du complément de tous les malades (sauf un) vis-à-vis d'un antigène gourmeux. Tous les malades qui ont eu une réaction positive ont reçu du sérum et ont guéri ; celui qui avait une réaction de fixation négative est mort. On aurait voulu faire une démonstration rigoureuse de l'action du sérum qu'on n'aurait pu mieux opérer.

Les autres documents que nous ne pouvons pas publier s'accordent tous à considérer le sérum antigourmeux comme une médication vraiment efficace, et donnant, concurremment avec les moyens classiques de traitement, des résultats que les moyens thérapeutiques seuls sont incapables de donner.

*(Institut Pasteur et Laboratoire militaire
de recherches vétérinaires.)*

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'IMMUNITÉ LOCALE OCULAIRE.

par P.-L. CARRÈRE.

« Tout en restant solidaire de l'organisme, chaque organe peut réagir, en face de l'infection et de l'immunité, pour son propre compte. Non seulement chaque virus a son organe, mais aussi chaque organe a son immunité. » Ces conclusions de Besredka (1), bases de nouvelles conceptions de l'infection et de l'immunité, sont-elles applicables à l'œil?

En ce qui concerne l'infection, on sait que les tissus oculaires sont réceptifs pour certains microbes ou virus. Le sac conjonctival seul est réceptif pour le bacille de Weeks et le diplo-bacille de Morax. La cornée est particulièrement réceptive pour les ultra-virus qui provoquent les affections désignées sous le nom d'Ectodermoses : vaccine, virus encéphalitique, virus herpétique, virus salivaire kératogène...

Au point de vue de l'immunité, on a démontré que la cornée, guérie d'une pustule vaccinale, est le plus souvent réfractaire à une seconde inoculation d'épreuve, tandis que la cornée opposée l'est moins, et que la peau ne l'est pas du tout. Levaditi, Harvier et Nicolau (2) ont démontré qu'il en est de même en ce qui concerne la cornée vis-à-vis des virus encéphalitiques.

L'inoculation dans le sac conjonctival de cultures virulentes de charbon ou de sang charbonneux ne provoque pas d'infection : « phénomène d'immunité naturelle locale dont le mécanisme reste à déterminer » (3). Infection locale, immunité

(1) A. BESREDKA, Immunité générale par immunisation locale. *Bull. Inst. Pasteur*, 20, 30 juin et 15 juillet 1922.

(2) LEVADITI, P. HARVIER et S. NICOLAU, Etude expérimentale de l'encéphalite dite « léthargique ». *Ces Annales*, 36, n° 2, p. 105.

(3) M. AITOFF, Inoculation du charbon par la muqueuse conjonctivale. *Ces Annales*, 36, 1922, p. 567.

locale acquise ou naturelle, l'œil semble donc bien jouir d'une certaine autonomie dans l'organisme.

En entreprenant l'étude expérimentale de l'immunité locale oculaire, j'ai eu pour but, tout d'abord, de rechercher si les divers tissus de l'œil pouvaient acquérir une immunité propre, indépendante de l'organisme, vis-à-vis des microbes pyogènes : staphylocoque, streptocoque, pneumocoque. Et cette immunité locale étant, si possible, acquise, étudier comparativement les réactions histologiques des divers tissus oculaires immunisés et non immunisés. C'est qu'en effet, l'immunité locale s'établit sans l'apparition des « anticorps » jusqu'ici considérés comme les agents actifs de l'immunité; il faut donc essayer de déceler, au point même où il exerce son action, le processus de réaction des tissus devenus réfractaires. A cet égard, la cornée, de composition histologique simple, avasculaire, accessible directement, dont les lésions peuvent être suivies *in vivo*, avec des moyens permettant de pousser très loin l'investigation, m'a paru être un objet d'étude favorable.

J'ai divisé ce travail en deux parties; la première, dans laquelle sont indiquées les techniques employées, relate les observations cliniques; la deuxième est consacrée à l'étude histologique comparée de cornées immunisées et non immunisées.

I. — Techniques et observations cliniques.

Pour obtenir l'immunisation locale oculaire, j'ai procédé à des instillations répétées de la substance vaccinante dans le sac conjonctival, ou bien à l'inoculation sous-conjonctivale ou rétro-oculaire de cette substance, enfin à son inoculation dans la chambre antérieure après soustraction préalable d'humeur aqueuse.

Les vaccins utilisés ont été, le plus souvent, des bouillons-vaccins obtenus selon la méthode préconisée par Besredka (1). J'ai employé aussi des cultures microbiennes dissoutes ou

(1) A. BESREDKA, Etude sur l'immunité locale. Le pansement antistaphylococcique. *C. R. Soc. Biol.*, **89**, p. 7 et A. BESREDKA et URBAIN, Etude sur l'immunité locale. Le pansement antistreptococcique, *ibid.*, **89**, n° 25, p. 306.

« lysées » par le cyanure de mercure ou la bile. Les microbes dont je me suis servi étaient des souches de staphylocoque, de streptocoque, de pneumocoque de provenances diverses.

Quant au choix des animaux, je me suis adressé au lapin et surtout au cobaye. En général, le même animal servait à la fois comme vacciné et comme témoin : l'œil droit, par exemple, recevant la substance immunisante, l'œil gauche ne recevant rien ou recevant du bouillon ordinaire. Cette façon de procéder a un double avantage : elle économise les animaux et surtout elle permet d'éviter les causes d'erreurs imputables à la culture et à l'animal.

L'inoculation d'épreuve était faite, dans l'œil vacciné et l'œil témoin, avec la même aiguille et une seringue graduée ; de sorte que chaque œil recevait, aussi exactement que possible, la même dose de culture microbienne, en eau salée physiologique.

Je ne puis rapporter *in extenso* le protocole de toutes les expériences ; je me contenterai de donner la caractéristique des faits observés cliniquement en les classant suivant le mode de l'immunisation et le lieu de l'inoculation d'épreuve.

I. — INSTILLATIONS CONJONCTIVALES DE VACCINS.

A. — BOUILLON-VACCIN ANTISTAPHYLOCOCCIQUE. — Les expériences ont porté sur trois lapins et cinq cobayes ; chez chacun de ces animaux, l'œil droit recevait, toutes les heures environ, deux gouttes de bouillon-vaccin ; l'œil gauche recevait du bouillon ordinaire et ce pendant cinq ou six heures. Le lendemain, ou le surlendemain, l'inoculation d'épreuve était pratiquée dans la cornée, la chambre antérieure ou le vitré.

1^o *Inoculation d'épreuve intracornéenne* (deux lapins, trois cobayes).

Dès l'inoculation, la cornée, de chaque côté, présente une infiltration blanchâtre autour du point de pénétration de la culture microbienne. Le lendemain, alors que du côté gauche (œil non vacciné, témoin) l'infiltration s'est étendue à la presque totalité de la cornée ; du côté droit, au contraire, l'infiltration de la veille a diminué (cas du lapin 1) ou est stationnaire (lapin 2, cobayes 1, 2, 3). Après quarante-huit heures, la diffé-

rence entre les deux yeux s'accroît : l'œil droit reprend un aspect normal ; à la loupe binoculaire, on constate une légère infiltration au niveau des lames moyennes de la cornée en un seul point ; l'œil gauche est le siège d'une violente inflammation : chémosis, sécrétion conjonctivale, abcès de la cornée. Généralement, après le troisième jour (lapin 1, cobayes 2, 3) ou le quatrième (lapin 2, cobaye 1), l'œil droit est redevenu normal. A l'œil gauche, l'infection évolue et se termine, après une quinzaine de jours, par atrophie du segment antérieur.

2° *Inoculation d'épreuve dans la chambre antérieure* (un lapin).

Le lendemain de l'inoculation, l'œil gauche, témoin, présente les signes d'une violente inflammation du segment antérieur : sécrétion conjonctivale, chémosis, infiltration des lames profondes de la cornée, la chambre antérieure est remplie d'un exsudat blanchâtre ; à l'œil droit, on note une légère sécrétion conjonctivale, un léger cercle périkératique, un dépôt blanc-jaunâtre dans le fond de la chambre antérieure ; l'iris paraît normal. Pendant deux jours, ces symptômes cliniques restent à peu près identiques ; à partir de ce moment, l'œil droit reprend un aspect normal : le dépôt de la chambre antérieure se résorbe peu à peu et, cinq jours après l'inoculation, il ne reste aucune trace d'infection. A l'œil gauche, une panophtalmite a évolué, amenant la fonte purulente de l'organe.

3° *Inoculation d'épreuve dans le vitré* (2 cobayes). Le lendemain même de l'épreuve, pour chaque animal, les deux yeux sont le siège d'une inflammation intense qui évolue comme une panophtalmite, causant la fonte purulente de l'organe.

B. BOUILLON-VACCIN ANTISTREPTOCOCCIQUE. — Les expériences ont porté sur trois cobayes ; même protocole que pour le bouillon antistaphylococcique. Les résultats obtenus sont entièrement superposables à ceux que nous venons de décrire : même rapidité de disparition de l'infiltration cornéenne, même résorption des microbes inoculés dans la chambre antérieure en ce qui concerne l'œil vacciné. L'œil témoin réagit en faisant une inflammation localisée au segment antérieur ou une panophtalmite. L'inoculation d'épreuve dans le vitré est suivie, pour l'œil vacciné comme pour le témoin, de panophtalmite.

C. BOUILLON-VACCIN ANTIPNEUMOCOCCIQUE. — L'expérience a été faite sur deux cobayes; l'épreuve d'immunisation a porté sur l'inoculation intracornéenne et intracamérienne; les résultats obtenus sont semblables à ceux que j'ai déjà décrits. A noter, cependant, l'allure subaiguë, la lente évolution de l'infection de l'œil témoin; l'œil vacciné redevenant normal après cinq ou six jours.

D. CULTURES LYSÉES PAR LE CYANURE DE MERCURE. — Une culture jeune de staphylocoque est diluée dans 3 cent. cubes d'eau salée physiologique, pour donner une suspension assez riche (environ 2 milliards de germes par cent. cube); on y ajoute 10 gouttes de cyanure de mercure à 1 p. 100. On met à l'étuve à 37°; après deux ou trois heures, on obtient un liquide légèrement opalescent qui sert à l'instillation.

Les expériences avec ce vaccin n'ont porté que sur deux cobayes qui ont été éprouvés après quarante-huit heures, l'un par inoculation dans la cornée, l'autre par inoculation dans la chambre antérieure. Les résultats obtenus m'ont paru moins nets qu'avec les bouillons-vaccins, la résorption des microbes inoculés dans l'œil vacciné a été plus lente, accompagnée d'une légère réaction inflammatoire; ce n'est qu'après dix jours que l'œil a repris son aspect normal. Les symptômes inflammatoires de l'œil témoin étant en tous points comparables à ceux des premières expériences, preuve que ni la culture, ni l'animal n'étaient en cause.

De ces expériences, on peut conclure que : *par inoculation d'un vaccin approprié dans le sac conjonctival, il est possible, en vingt-quatre ou quarante-huit heures, d'immuniser l'œil contre l'inoculation, dans la cornée ou dans la chambre antérieure, de cultures microbiennes qui provoquent dans l'œil témoin une infection plus ou moins grave. Ce mode de vaccination ne protège pas contre l'inoculation de cultures microbiennes dans le vitré. Il s'agit d'une immunité strictement localisée à l'œil qui a reçu le vaccin.*

II. — INJECTIONS SOUS-CONJONCTIVALES DE VACCIN.

A. BOUILLON-VACCIN ANTISTAPHYLOCOCCIQUE. — Deux cobayes reçoivent chacun, sous la conjonctive de l'œil, 0 c. c. 5 de ce vaccin. Vingt-quatre heures après, l'un est éprouvé par inoculation intracornéenne, l'autre par inoculation dans la chambre antérieure. A noter que le chémosis provoqué par l'injection vaccinale a complètement disparu en dix heures environ. Cette méthode donne des résultats en tous points comparables à ceux qui ont été obtenus par instillation de bouillon-vaccin dans le sac conjonctival.

B. BOUILLON-VACCIN ANTISTREPTOCOCCIQUE. — Un cobaye reçoit, en injection sous-conjonctivale, à l'œil droit, 0 c. c. 5 de bouillon-vaccin antistreptococcique. Après quarante-huit heures, il est éprouvé par inoculation intracornéenne. Six heures après environ, l'œil gauche témoin présente une véritable bulle d'œdème de la cornée avec chémosis et sécrétion conjonctivale, tandis qu'à l'œil droit il semble que l'infiltration d'inoculation a diminué. Le lendemain, l'œil droit examiné à la loupe binoculaire présente une sorte de halo diffus de toute la cornée; à l'œil gauche, vaste ulcération et perforation de la cornée, hernie de l'iris. En trois jours, l'œil droit a repris son état normal; à l'œil gauche, suppuration de tout le segment antérieur qui cicatrise avec atrophie du globe.

Un lapin qui avait reçu, en injection sous-conjonctivale, à l'œil droit 2 cent. cubes de bouillon-vaccin antistreptococcique est éprouvé quarante-huit heures après par inoculation dans le vitré. Il se développa en quelques heures une violente inflammation aux deux yeux, provoquant une panophtalmite qui, à l'œil droit, a évolué par la suite avec une allure subaiguë sans amener la perforation de la coque oculaire; à l'œil gauche, vaste ulcération cornéenne au troisième jour, fonte purulente de l'organe.

C. BOUILLON-VACCIN ANTIPNEUMOCOCCIQUE. — Un cobaye reçoit, en injection sous-conjonctivale, à l'œil droit, 0. c. c. 5 de bouillon-vaccin antipneumococcique. Après vingt-quatre heures, il est éprouvé par inoculation dans la chambre antérieure.

Le lendemain, l'œil droit présente de la sécrétion avec hyperémie conjonctivale, cercle péricératique net; on note un véritable petit hypopion occupant le tiers à peu près de la chambre antérieure, sans atteinte de la cornée ni de l'iris; l'œil gauche est chémotique, toute la chambre antérieure est envahie par un exsudat qui masque l'iris.

Le jour suivant, les symptômes sont sensiblement les mêmes; je ponctionne les deux chambres antérieures, le produit de ponction est étalé sur lames et coloré. Les préparations obtenues sont comparables: on note en effet, pour chacune d'elles, un réticulum fibreux, beaucoup plus important pour l'œil droit, enfermant des leucocytes polynucléaires, des pneumocoques encapsulés bien colorables, aucune figure de phagocytose; les polynucléaires trouvés dans l'œil droit sont en majorité des éosinophiles.

A la suite de la ponction, l'hypopion ne s'est pas reformé dans la chambre antérieure de l'œil droit qui a repris un aspect normal quatre jours après. A l'œil gauche a évolué une inflammation subaiguë de tout le segment antérieur amenant son atrophie avec leucome adhérent.

D. CULTURES LYSÉES. — On sait en quoi consiste le phénomène de Neufeld: si à 1 cent. cube d'une culture de pneumocoque de vingt-quatre heures, en milieu de Truche, on ajoute quatre gouttes de bile de lapin glycérinée, en quelques minutes on constate la destruction des microbes: le milieu devient transparent. J'ai utilisé ce procédé pour obtenir une dissolution des protéines de pneumocoque comme vaccin.

Un cobaye reçoit, en injection sous-conjonctivale, à l'œil droit, 0 c. c. 5 de pneumocoque lysé par le procédé indiqué; vingt-quatre heures après, inoculation d'épreuve intracornéenne. Le lendemain, l'œil droit paraît normal: cependant, à la loupe, on distingue, autour du point d'inoculation, un petit point blanc, siégeant dans les lames moyennes, entouré d'un semis de points semblables plus petits: l'œil gauche présente une infiltration localisée de la cornée avec ulcération punctiforme. Trois jours après, il était impossible de déceler la moindre trace de lésion à droite; l'œil gauche présentait un abcès cornéen étendu avec large ulcération qui a

cicatrisé, en une quinzaine de jours, avec leucome adhérent.

La même expérience, renouvelée dans les mêmes conditions sur deux autres cobayes, a donné des résultats semblables.

III. — INOCULATION DANS LA CHAMBRE ANTÉRIEURE.

Deux cobayes reçoivent dans la chambre antérieure de l'œil droit, après ponction et écoulement d'humeur aqueuse, environ 0 c. c. 02 de bouillon-vaccin antistreptococcique. Après vingt-quatre heures, l'un est éprouvé par inoculation intracornérienne (cob. III *a*), l'autre par inoculation dans le vitré (cob. III *b*). En ce qui concerne le cobaye III *a*, l'évolution n'offre rien de particulier à signaler qui n'ait été décrit au cours des expériences précédentes.

Le cobaye III *b* inoculé dans le vitré a réagi bien différemment. Le lendemain, extérieurement, à part un léger cercle périkératique, l'œil droit paraissait normal; à l'éclairage de la pupille on notait le reflet spécial dit œil de chat amaurotique, dû à un exsudat blanchâtre du vitré, le fond d'œil étant inéclairable. Pendant deux jours, même symptomatologie; au troisième jour, le fond d'œil s'éclairait faiblement comme à travers une légère brume; le quatrième jour on pouvait déceler dans le vitré des petits corps flottants, la rétine paraissant normale. Six jours après l'inoculation d'épreuve, l'œil droit reprit son aspect normal, alors qu'à l'œil gauche évoluait une panophtalmite.

J'ai refait l'expérience sur un lapin et j'ai pu obtenir les mêmes résultats, en me servant d'un bouillon-vaccin antipneumococcique et en inoculant un pneumocoque isolé d'un œil atteint d'ulcération de la cornée.

De ces expériences, on peut conclure que : *l'inoculation sous-conjonctivale de vaccin approprié protège l'œil contre l'inoculation dans la cornée ou la chambre antérieure de cultures microbiennes qui provoquent dans l'œil témoin une infection plus ou moins grave. Ce mode de vaccination ne protège pas contre l'inoculation d'épreuve dans le vitré; seule la vaccination par inoculation dans la chambre antérieure paraît protéger contre l'inoculation d'épreuve dans le vitré.*

Il y a là des indications intéressantes pour la physiologie

oculaire et surtout pour la vaccinothérapie. L'imprégnation des divers tissus oculaires par le vaccin dépend du mode d'introduction de ces vaccins. Pour la cornée, l'asorption se fait aussi bien par instillation que par injection sous-conjonctivale; ces mêmes voies permettent au vaccin de pénétrer dans la chambre antérieure jusqu'au contact de l'iris. Ceci n'a rien d'étonnant et vient confirmer ce que l'on connaît sur la perméabilité de la cornée pour certaines substances en solution.

Pour que la substance vaccinnante atteigne le vitré, il est nécessaire qu'elle soit introduite dans la chambre antérieure après soustraction préalable d'humeur aqueuse; on peut se demander si ce n'est pas justement à la faveur du déséquilibre de tension que se fait l'imprégnation du vitré.

Quoi qu'il en soit, c'est le mécanisme intime de l'immunsation locale obtenue dont je voulais saisir le processus, aussi est-ce à son étude que j'en arrive. Je dois dire, d'ailleurs, que mes investigations histologiques ne m'ont pas donné tout ce que je croyais pouvoir en attendre; ce ne sont guère que quelques constatations que je puis apporter ici, espérant pouvoir compléter les faits et arriver à une explication du mécanisme de l'immunité locale oculaire.

II. — Recherches histologiques.

Des cobayes ayant été immunisés par l'un quelconque des procédés décrits, j'ai sacrifié ces animaux, vingt-quatre, quarante-huit heures, trois jours et cinq jours après l'inoculation intracornéenne d'épreuve. Les yeux ont été fixés par le liquide de Bouin ou le formol salé, inclus à la paraffine, débités en coupe en séries. Comme colorant, j'ai employé : l'hématéine éosine orange, le picro-noir naphtol, la méthode de Gram.

1° Animal sacrifié vingt-quatre heures après l'inoculation intracornéenne d'épreuve.

A. ŒIL TÉMOIN : présentait cliniquement un abcès dans la partie moyenne de la cornée avec ulcération punctiforme.

Sur les coupes, l'abcès est constitué par un amas de leuco-

cytes polynucléaires, la plupart en voie de leucolyse. A ce niveau, les lames de la cornée ont disparu; celles qui bordent la masse leucocytaire sont en voie de dégénérescence, vacuolisées, et prennent mal les colorants. Toute la cornée présente une infiltration leucocytaire qui distend les travées interlamellaires. L'épithélium antérieur, sauf au niveau de l'ulcération, paraît normal; il en est de même de l'endothélium. Dans le fond de la chambre antérieure, on note un exsudat fibrino-leucocytaire; dans le corps ciliaire existe une infiltration diffuse constituée par des polynucléaires dont quelques éosinophiles; l'iris paraît normal. Par la méthode de Gram, on décèle de nombreux microbes disséminés au milieu de l'amas leucocytaire.

B. ŒIL VACCINÉ : cliniquement, on pouvait constater trois petits amas punctiformes, blanchâtres, situés au niveau des lames moyennes de la cornée, comme si l'infiltration massive de l'inoculation s'était fragmentée.

Sur les coupes, les amas sont constitués par des polynucléaires, la plupart éosinophiles, qui distendent les lames cornéennes sans les désagréger. Toute la cornée est infiltrée par des polynucléaires éosinophiles essaimés entre les amas, plus abondants au niveau du limbe.

La chambre antérieure ne contient aucun exsudat; le grand cercle artériel de l'iris est entouré d'un manchon de leucocytes, le plus grand nombre éosinophiles.

Par la méthode de Gram, on décèle de rares microbes disséminés au niveau des amas. Il n'y a pas de figures de phagocytose.

2° Animal sacrifié quarante-huit heures après l'inoculation intracornéenne d'épreuve.

A. ŒIL TÉMOIN : cliniquement, infiltration diffuse profonde avec ulcération de la cornée.

Sur les coupes, on constate un véritable abcès occupant les deux tiers de la cornée, situé au niveau des lames moyennes; il est constitué par des leucocytes polynucléaires, le plus grand nombre en voie de leucolyse. Les lames cornéennes ont disparu; au niveau du foyer on peut suivre, sur les bords, leur processus

de dégénérescence par vacuolisation. Toute la cornée est infiltrée de leucocytes polynucléaires et mononucléaires qui distendent les travées interlamellaires. En un point correspondant au centre du foyer décrit, l'épithélium antérieur a été détruit par le processus infectieux. La chambre antérieure est en partie occupée par un exsudat fibrino-leucocytaire. Le corps ciliaire, l'iris, dont les vaisseaux sont distendus, présentent une légère infiltration cellulaire.

Par la méthode de Gram, on peut se rendre compte que le centre de la lésion cornéenne est occupé par un amas de staphylocoques entouré d'une zone hyaline amorphe. Des amas de microbes se retrouvent disséminés parmi les leucocytes. On ne peut déceler de figures de phagocytose.

B. (ŒIL VACCINÉ : cliniquement, l'œil ne présentait plus qu'un petit point d'infiltration au point d'inoculation.

Sur les coupes, on distingue très nettement le point de pénétration de l'aiguille ; à ce niveau, il y a eu éboulement des cellules de l'épithélium antérieur qui sont venues, suivant la conception classique, combler le vide laissé par la section des lames cornéennes ; ces cellules s'infiltrèrent jusqu'à la partie moyenne de la cornée. Au point d'inoculation, on constate une petite masse constituée par des leucocytes polynucléaires, le plus grand nombre éosinophiles ; cet amas distend, à ce niveau, les lames de la cornée qui paraissent être intactes ; par ailleurs, la membrane paraît normale, l'épaisseur n'est pas augmentée ; l'épithélium antérieur, l'endothélium de Descemet sont normaux. Sur toute l'étendue de la cornée, entre les lames, sont essaimés des leucocytes polynucléaires éosinophiles qui forment, au niveau du limbe, de véritables manchons périvasculaires. La chambre antérieure, le corps ciliaire, l'iris ne présentent aucune modification.

Par la méthode de Gram, on décèle, au niveau de l'amas central, quelques rares staphylocoques bien colorables. Pas de figures de phagocytose.

3^e Animal sacrifié trois jours après l'inoculation intracornéenne d'épreuve.

Je ne décrirai pas les lésions de l'œil témoin qui siègent au niveau de la cornée, du corps ciliaire, de l'iris.

Pour l'œil vacciné, cliniquement, on ne décelait qu'un léger cercle périkeratique ; sur les coupes suivies en série, j'ai pu retrouver le point d'inoculation au niveau duquel on distinguait encore un amas de quelques leucocytes, pas de microbes. La cornée paraissait avoir repris son état normal ; au niveau du limbe, seuls existaient encore des manchons périvasculaires de leucocytes polynucléaires éosinophiles.

4° Animal sacrifié cinq jours après l'inoculation intracornéenne d'épreuve.

Le processus infectieux de l'œil témoin s'étendait à tout le segment antérieur, avec perforation de la cornée, hernie de l'iris.

L'œil vacciné paraissait normal, et de fait, sur les coupes, il était impossible de trouver la moindre altération histologique.

En résumé, les constatations histologiques confirment les données cliniques : absence de réaction tumultueuse au niveau de la cornée vaccinée lors de l'inoculation d'épreuve. La réaction se traduit par un appel leucocytaire modéré qui disparaît très rapidement. Ce qu'il y a de plus remarquable, c'est l'intégrité du tissu cornéen ; les lames de la cornée sont simplement distendues par les amas leucocytaires ; nous les avons trouvées vacuolisées, détruites sur l'œil témoin. Les microbes, après quarante-huit heures, ont complètement disparu dans la cornée vaccinée ; ils ont colonisé dans la cornée témoin.

Enfin, il faut souligner que les leucocytes polynucléaires sont presque tous des éosinophiles pour l'œil vacciné ; en majorité, ils sont neutrophiles pour l'œil témoin. Quel rôle jouent ces leucocytes éosinophiles ? On a signalé leur présence dans un certain nombre d'affections oculaires. Sedan et Herrmann (1) tout récemment, les ont signalés, au niveau de la cornée, au cours d'une infection expérimentale par le bacille typhique ; aussi faut-il être réservé sur leur signification en ce qui concerne l'immunité.

Notons aussi l'absence de figures de phagocytose, tout en faisant des réserves sur ce point ; en effet, il est fort possible que la phagocytose s'exerce très rapidement après l'inoculation

(1) SEDAN et HERRMANN, Recherches expérimentales sur l'infection éberthienne de la cornée. *Ann. d'Oculistique*, 161, 4^e 1., p. 259.

et cesse ensuite; il faut pratiquer, ce que j'ai entrepris, des examens histologiques rapprochés du moment de l'inoculation d'épreuve.

Je ne voudrais pas conclure, d'après ces seules observations, sur le mécanisme de l'immunité locale; néanmoins, l'absence de phagocytose, le fait de l'appel leucocytaire minime, la constatation que les lames de la cornée ne paraissent subir aucune action nocive de la part des microbes, m'incitent à accepter l'hypothèse de travail donnée par Besredka (1), à savoir que l'immunité locale consisterait principalement en une désensibilisation des cellules et tissus réceptifs.

La conclusion pratique des expériences que je viens de rapporter est la facilité, la rapidité de l'immunisation locale des divers tissus oculaires. Si on rapproche ce fait expérimental de cet autre fait expérimental, la difficulté de l'immunisation oculaire par immunisation de l'organisme, — bien que Zade (2) ait décrit un processus de défense par phagocytose, dans la cornée, chez l'animal immunisé, — il en découle une indication formelle pour la pratique de la vaccinothérapie. Ce traitement ne doit plus être appliqué par voie sous-cutanée, mais localement, Pour l'œil, comme pour d'autres organes : peau, intestin, la vaccination locale doit remplacer la vaccination générale. J'ai déjà donné quelques résultats obtenus par la vaccination locale d'affections oculaires diverses (3), faisant remarquer la rapidité de la guérison après application, *in loco*, de bouillons-vaccins appropriés. Les résultats des expériences permettent de concevoir la cause de cette rapidité d'action : sous l'influence de vaccins, les tissus immunisés deviennent indifférents vis-à-vis des microbes et de leurs toxines, d'où la cessation du processus nécrotique et la réparation des lésions.

(Travail du Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté de Médecine de Montpellier, Prof. Lisbonne.)

(1) A. BESREDKA, Quelques considérations sur le mécanisme de l'immunité locale. *C. R. Soc. Biol.*, 89, p. 1156.

(2) ZADE, A propos d'inoculations bactériennes intracornéennes. Analyse in *Ann. d'Ocul.*, 158, 1921, p. 70.

(3) L. CARRÈRE, La vaccination locale en thérapeutique oculaire. *Bull. de la Soc. d'Ophth. de Paris*, n° 3, 1924, p. 106; le traitement des dacryocystites par la vaccination locale. *Soc. des Sciences méd. et biol. de Montpellier*, 14 mars 1924.

ACTION COMPAREE DE L'EAU DISTILLÉE ET DU SÉRUM PHYSIOLOGIQUE SUR LA VITALITÉ DE QUELQUES MICROBES

par L. PANISSET, J. VERGE et V. CARNEIRO.

RECHERCHES ANTÉRIEURES.

Miquel (1), qui a étudié de très près le pouvoir infertilisant du sel marin, lui attribue la faculté de s'opposer à la multiplication des bactéries quand il se trouve dissous dans les bouillons à 16,5 p. 100. En mesurant le pouvoir fécondant du chlorure de sodium vis-à-vis des germes atmosphériques, il a trouvé que ce pouvoir croît de 0 à 8 p. 1.000 et décroît de 8 à 20 p. 1.000.

Gotschlich (2), en une revue très documentée, résume la plupart des travaux allemands en la matière.

Ficker (3) montre que l'eau distillée et la solution physiologique pure ont une action bactéricide énergique, à condition que les microbes leur soient ajoutés en petite quantité et sans traces du milieu de culture primitif.

Le bacille du choléra serait détruit très rapidement; même en ensemençant 60.000 à 40.000 germes par centimètre cube, la vitalité disparaîtrait en deux à trois jours. En revanche, lors d'un ensemencement abondant, les vibriions cholériques se conserveraient des semaines et des mois: les micro-organismes meurent d'abord en grand nombre, puis les survivants se multiplient, ce qui explique leur conservation.

Lœb (4) constate que le chlorure de sodium est toxique pour toutes les cellules vivant dans la mer et que cette action toxique est neutralisée par les sels de potassium et de calcium.

(1) MIQUEL et CAMBIER. *Traité de bactériologie pure et appliquée*, Naud, 1902.

(2) GOTSCHLICH. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Iena, 1912.

(3) FICKER. *Zeitschrift für Hygiene*, 29, 1899.

(4) LÖEB. *Biochemische Zeitschrift*, 2, 1906, p. 81.

D'Hérelle (1) s'aperçoit que les vibrions cholériques et les bacilles dysentériques sont rapidement détruits dans l'eau physiologique : vingt-quatre à quarante-huit heures. « Cette action microbicide de l'eau physiologique, ajoute l'auteur, est assez étrange ; même quand il s'agit d'émulsions relativement très concentrées, renfermant de cinquante à cent millions de bactéries (vibrions cholériques ou bacilles dysentériques) par centimètre cube, la stérilisation est totale en quelques heures à la température de 37°. Ces bactéries restent au contraire vivantes pendant plusieurs jours dans de l'eau de robinet. Ce qui est encore plus singulier, c'est qu'on ait adopté l'eau physiologique pour la préparation des émulsions bactériennes, admettant *a priori* que les bactéries *devaient* se conserver plus longtemps vivantes dans ce milieu qualifié d'isotonique. »

Wilson et Shearer (2) prétendent que l'action stérilisante du chlorure de sodium à 9 p. 1.000 peut être inhibée, en totalité ou en partie, à la faveur du chlorure de calcium.

Legroux et Eliava étudient l'action de substances diverses sur le développement des bactéries vivantes (3). L'eau distillée détruit rapidement la plupart des microbes ; même l'eau dite physiologique, à 9 grammes de chlorure de sodium p. 1.000, considérée comme isotonique avec les corps microbiens, ne laisse pas de les altérer, surtout à la température de l'étuve.

De plus, ces auteurs mentionnent que les substances ajoutées à l'eau physiologique : bouillon, sérum, extrait globulaire agissent dans des limites très étroites ; un écart de moins de 1/10 de centimètre cube d'une de ces substances dans 100 centimètres cubes détruit une partie des germes ou favorise leur culture, dans les conditions de ces expériences.

Duthoit (4) apporte la preuve expérimentale que des microbes (bacille d'Eberth, bacilles paratyphiques A et B, *Bacterium coli*, *Staphylococcus pyogenes aureus*, pneumobacille de Friedländer), mis en suspension dans l'eau salée à 9 p. 1.000 au

(1) D'HÉRELLE. *Le bactériophage*, Masson, 1921.

(2) Cités par Duthoit.

(3) LEGROUX et ELIAVA. *Ces Annales*, 1921, p. 713.

(4) DUTHOIT. *Comptes rendus de la Société de biologie*, 89. 1923, p. 548, 550 et 553.

taux de 5 à 20 millions d'éléments vivants par centimètre cube, meurent très rapidement. En effet, après moins de vingt-quatre heures, les ensemencements sur gélose ne donnent plus aucune colonie et après un ou deux jours de contact des ensemencements beaucoup plus abondants en bouillon restent stériles.

D'après les études de Duthoit, il se produit entre le milieu et le microbe des échanges osmotiques qui font que les germes meurent rapidement dans l'eau salée. Il existe d'ailleurs, pour chaque variété microbienne, un *taux optimum de concentration* pour lequel les échanges sont retardés et la vitalité du microbe plus longtemps maintenue.

Tout récemment, H. Schmidt (1) montre l'action de la solution chlorurée sodique sur les bactéries. A l'exception du gonocoque qui meurt rapidement, les germes résistent beaucoup plus longtemps dans la solution physiologique que ne le laisse supposer Duthoit d'après ses recherches.

A notre tour, nous avons voulu comparer l'action microbicide de l'eau distillée et du sérum physiologique sur différents microbes. Point n'est besoin d'insister, après d'Hérelle, sur l'intérêt qui s'attache à ces tentatives et les modifications que celles-ci sont susceptibles d'apporter à la technique bactériologique : le bactériologiste, en effet, bien qu'ignorant parfois des perturbations apportées par le sérum physiologique et l'eau distillée à la vitalité des diverses espèces microbiennes, n'en continue pas moins d'utiliser systématiquement l'eau salée pour la préparation de ses émulsions. Nous avons choisi, pour entreprendre cette étude, une bactérie sporulée : la bactéridie charbonneuse et quelques germes asporulés, les uns Gram positif : staphylocoque blanc et staphylocoque doré; les autres Gram négatif : *Pasteurella aviaire*, *Bacterium sanguinarium* de la typhose des volailles, *Bacterium coli*, pneumobacille de Friedländer.

TECHNIQUE DE NOS RECHERCHES.

Nous avons employé des cultures microbiennes de vingt-quatre heures sur gélose ordinaire. Les prélèvements, en ces

(1) HANS SCHMIDT. *Centralblatt für Bakteriologie, Originale*, 91, 30 avril 1924.

cultures, sont effectués au moyen de l'anse de platine et introduits ensuite dans des tubes renfermant exactement 5 cent. cubes d'eau distillée ou de sérum physiologique à 8 p. 1.000.

L'ensemencement initial ainsi réalisé, les tubes sont capuchonnés et placés à l'étuve à 37°. Chaque matin, à partir de la vingt-quatrième heure, on ensemence sur gélose ordinaire une anse de liquide prélevée au moyen du fil de platine.

Les résultats obtenus au cours de cinq expériences successives sont condensés dans les tableaux suivants :

NATURE du germe	DURÉE DE LA VITALITÉ EN JOURS					MOYENNE générale en jours
	Expérience I	Expérience II	Expérience III	Expérience IV	Expérience V	
I. — Eau distillée.						
Staphylocoque doré.	14	3	10	74	34	27
Pasteurella aviaire.	—	—	—	3 heures	4 h. 30	3 h. 45
Typhose aviaire . .	14	23	26	62	23	29
Colibacille	74	—	—	—	—	74
Friedländer.	76	—	—	—	—	76
Bactériole charbonneuse . .	20	9	80	—	—	36
II. — Sérum physiologique à 8 p. 1.000.						
Staphylocoque doré.	11	4	11	9	9	9
Pasteurella aviaire.	—	—	—	3 heures	4 h. 30	3 h. 45
Typhose aviaire . .	15	9	8	18	11	12
Colibacille	30	9	—	—	—	20
Friedländer	43	34	—	—	—	39
Bactériole charbonneuse . .	11	8	64	55	50	37

Nos essais confirment donc, d'une façon générale, les indications des divers auteurs. Sauf peut-être pour la bactéridie charbonneuse, l'eau distillée représente un milieu de choix pour la conservation du germe, le maintien de sa forme et surtout la persistance de sa vitalité. La longévité des quelques organismes microbiens par nous utilisés accuse une moyenne plus forte dans l'eau distillée qu'en sérum physiologique. Quelles sont les causes de ce phénomène? Faut-il, comme Duthoit, rapporter l'action bactéricide de l'eau salée à un processus d'échanges osmotiques qui inhiberait la vie microbienne

et la faculté reproductrice? Convient-il d'incriminer certains facteurs chimiques ou physiques : p^H du substratum cultural, teneur en électrolytes? Doit-on faire intervenir une action antiseptique née de la dissociation électrolytique des milieux au chlorure de sodium?

L'examen comparé des tableaux précédents suggère quelques réflexions :

1° Nos conclusions, beaucoup moins sévères que celles de d'Hérelle et de Duthoit, plaident en faveur d'une action bactéricide relativement lente du sérum physiologique.

Pour d'Hérelle, au contraire, la qualité stérilisante de l'eau salée est brutale et s'exerce en moins de quarante-huit heures. Duthoit va même plus loin, puisqu'il considère qu'après dix heures trente, les émulsions microbiennes sont virtuellement stérilisées et la grande majorité des germes meurt entre la première demi-heure et la quatrième heure.

Nous n'avons obtenu ces résultats qu'en ce qui concerne la *pasteurella aviaire*.

2° Insistons tout particulièrement sur ce fait, que nous n'avons jamais procédé, au cours de nos recherches, par ensemencement large des milieux nutritifs à partir de la culture initiale en eau distillée ou en sérum physiologique.

Cette technique permet peut-être d'expliquer les variations paradoxales, d'une expérience à l'autre, de la résistance de la bactériodie charbonneuse et de quelques autres germes.

3° Certaines conditions particulières peuvent influencer sur la vitalité d'un microbe et sa faculté de résistance : la moindre parcelle d'un milieu nutritif — bouillon par exemple — apportée lors de l'ensemencement suffit à troubler les résultats.

C'est pourquoi tous nos essais furent effectués en ensemençant l'eau distillée ou le sérum physiologique au moyen de cultures sur gélose ordinaire, prélevées délicatement avec le fil de platine.

4° La qualité du verre, la stérilisation plus ou moins prolongée de l'eau, les impuretés possibles du chlorure de sodium, l'âge des cultures qui servent de point de départ, la diversité des souches et des races microbiennes, leur accoutumance à vivre dans un milieu de moins en moins riche sont des facteurs

éminemment variables, susceptibles d'apporter de graves perturbations dans les essais réalisés (1).

5° Le développement très lent de certains microbes ensemencés en sérum physiologique et repiqués ultérieurement sur les milieux nutritifs habituels ne peut pas ne pas frapper l'expérimentateur.

Un staphylocoque doré, provenant d'une culture en eau salée et reporté sur gélose ordinaire, ne se développe souvent qu'après quarante-huit ou même soixante-douze heures d'étuve à 37°. Dans un cas particulièrement démonstratif, il nous a fallu attendre cinq jours avant de voir apparaître, à la surface de la gélose ensemencée en strie, les colonies classiques de ce staphylocoque.

. . .

En résumé, le sérum physiologique possède, à l'égard de certaines espèces microbiennes, une action bactéricide non négligeable. Cette action demeure, dans la règle, extrêmement variable : elle doit être envisagée et étudiée séparément pour chaque germe ; elle diffère souvent avec la race.

Contrairement à l'opinion courante, l'eau distillée permet aux micro-organismes de conserver au mieux leur vitalité. Sporulés ou non, les microbes cultivés en eau distillée ne semblent point présenter de changements marqués : la vitalité n'est pas amoindrie ; la faculté de croissance ne se ralentit point.

Nos études ont été trop brèves pour nous permettre de formuler en la matière la conclusion qui s'imposerait. Avant de songer à combattre la conception classique, il serait nécessaire de reprendre ces essais et de les étendre systématiquement au plus grand nombre possible d'espèces microbiennes.

(École vétérinaire d'Alfort.)

(1) Voir GORSCHLICH. *Loc. cit.*

DU RÔLE DE LA PHAGOCYTOSE DANS L'ACTION DU BISMUTH SUR LES TRYPANOSOMES ET LES SPIROCHETES

par R. SAZERAC et R. VAURS.

Le rôle de la phagocytose dans la défense de l'organisme ne semble pas limité à la lutte contre les microbes pathogènes, par voie d'englobement ou de digestion, ou même par neutralisation des toxines solubles. Un grand nombre d'observations montrent, en effet, que les leucocytes sont capables de fixer et, parfois, de transformer les poisons ou les médicaments introduits dans l'économie. Ces phénomènes d'absorption et de transformation semblent avoir pour conséquences la préservation contre le pouvoir toxique, ainsi que la diffusion de certains médicaments dans l'organisme et la mise en œuvre de leurs propriétés thérapeutiques.

Au début de cette étude, consacrée au rôle des phagocytes dans l'action du bismuth sur les trypanosomes et les spirochètes, nous croyons utile de rappeler brièvement les données les plus importantes déjà acquises relativement à l'intervention des globules blancs, en ce qui concerne les phénomènes d'intoxication aussi bien que les effets curatifs dus aux substances chimiques. On jugera mieux ainsi de l'intérêt que peuvent présenter les recherches dans cet ordre d'idées.

Après avoir étudié l'accoutumance de l'organisme au venin des serpents, à l'abrine du Jequirity, à l'ouabaïne et au curare, Calmette (1) est conduit à penser que « les fonctions remplies par les leucocytes à l'égard de tant de virus et de corps étrangers doivent s'exercer de même vis-à-vis de poisons divers ». Par la suite, le même auteur étend ses recherches au mécanisme de la préservation contre des doses relativement fortes d'atropine.

(1) CALMETTE. Ces *Annales*, 1895, p. 251.

L'injection de 0 gr. 20 de sulfate d'atropine, par voie intraveineuse, chez le lapin, ne provoque aucun effet toxique. Par contre, la dose de 2 milligrammes du même sel introduit dans la substance cérébrale amène rapidement les phénomènes d'intoxication ordinaires dus à l'atropine. De plus, si l'on sépare, après centrifugation, d'une part, le sérum clair du sang d'un lapin ayant reçu dans la veine 0 gr. 20 de sulfate d'atropine, puis, d'autre part, la partie renfermant les leucocytes, et, si l'on injecte, séparément, sérum (après concentration) et leucocytes, dans le cerveau de lapins neufs, on constate les phénomènes suivants : 1° l'injection de 0 c. c. 5 de sérum concentré représentant 1 cent. cube de sérum frais ne donne lieu à aucun accident grave; 2° l'injection, dans le même organe, de la masse leucocytaire, à la dose de 1 cent. cube, provoque immédiatement des accidents identiques à ceux que nous observons par injection intracérébrale de 0 gr. 001 environ d'atropine.

De ces résultats Calmette (1) conclut que les leucocytes des animaux naturellement réfractaires, comme, vraisemblablement, ceux des animaux vaccinés par accoutumance, possèdent le pouvoir d'arrêter et de fixer dans leur protoplasma les poisons chimiques tels que les alcaloïdes, de même qu'ils englobent et digèrent les microbes.

Lombard (2) confirme ces conclusions en ce qui concerne l'atropine et la strychnine.

Les substances minérales, solubles ou insolubles, peuvent être également fixées par les phagocytes. C'est ainsi que les sels de fer solubles sont absorbés par ces cellules, comme il ressort des travaux de Kobert (3) et de Metchnikoff (4) en particulier. Ce dernier a pu constater que le fer est fixé principalement par les leucocytes, les macrophages de la pulpe splénique et les cellules étoilées du foie.

Marcel Labbé et Lortat-Jacob (5) ont étudié l'absorption de l'iode par les leucocytes : à la suite de l'injection sous-cutanée

1) CALMETTE. *C. R. Soc. Biologie*. Cinquantenaire, 1899, p. 202.

(2) LOMBARD. *Thèse*, 1901.

(3) KOBERT. *Arbeiten des pharmakolog. Institutes zu Dorpat*, 1893 et 1894.

(4) METCHNIKOFF. *Ces Annales*, 1894.

(5) MARCEL LABBÉ et LORTAT-JACOB. *C. R. Soc. Biologie*, 1902.

ou intrapéritonéale de solutions iodo-iodurées ils ont vu que les leucocytes absorbaient l'iode, lequel peut être révélé, dans l'intérieur des cellules, par les réactifs chimiques.

Il résulte des observations de Samoïloff (1) que les sels solubles d'argent sont absorbés par les leucocytes.

D'après Stassano (2), les phagocytes fixent énergiquement les sels de mercures *solubles*, en particulier le bichlorure. Les leucocytes du sang d'un animal intoxiqué par le mercure, séparés par centrifugation, renferment presque tout le métal, alors que les hématies et le plasma n'en contiennent que des traces. A ce point de vue, les cellules endothéliales se comportent exactement comme les leucocytes en incorporant le mercure.

En ce qui concerne la fixation des substances *insolubles* par les phagocytes, on doit accorder une importance particulière aux recherches de Besredka (3) sur le rôle des leucocytes dans l'intoxication par le sulfure d'arsenic. L'auteur montre que l'injection de ce corps dans la cavité péritonéale provoque des phénomènes de chimiotaxie suivis de l'englobement des particules solides. En outre, la substance subit une sorte de digestion intraphagocytaire, qui se traduit extérieurement par sa désagrégation et sa transformation en un composé soluble. Ces observations ont été suivies de nouvelles recherches du même auteur, relatives au rôle des leucocytes dans l'intoxication par l'acide arsénieux (4) [corps soluble], d'où il résulte que, après injection d'une dose suffisante de ce corps, les leucocytes du sang, séparés par centrifugation, renferment de l'arsenic, alors que les hématies et le plasma en sont dépourvus.

Les sels *insolubles* de mercure sont également fixés et transformés par les phagocytes. Neisser a pu constater que les nodules formés à la suite de l'injection d'huile au calomel, chez le cobaye, renferment un grand nombre de leucocytes et de cellules granuleuses et qu'on y trouve des vaisseaux thrombosés infiltrés de granulations noires de mercure. Montel

(1) SAMOÏLOFF. *Lubarsk u. Ostertags Ergebnisse der allgemeinen Pathologie*, 1899.

(2) STASSANO. *C. R. Académie des Sciences*, 127, 1898, p. 680; 1899, p. 610 et 640; 1900, p. 322.

(3) BESREDKA. *Ces Annales*, 13, 1899, p. 49.

(4) BESREDKA. *Ces Annales*, 13, 1899, p. 209 et 465.

trouve dans ces nodules, obtenus par le même procédé, des cristaux de calomel et des particules de mercure; il y décele des leucocytes chargés d'une poussière grise. En pratiquant l'injection dans le sac lymphatique de la grenouille et le péritoine du cobaye, le même auteur observe l'englobement et la transformation du calomel par les leucocytes. Ces observations relatives au mercure peuvent contribuer notablement à expliquer l'efficacité des produits mercuriels dans le traitement de la syphilis.

Collet injecte dans le tissu sous-cutané du dos d'un cobaye 1 cent. cube d'une suspension de mercure dans l'eau additionnée de gomme arabique. Quatre jours après, ayant provoqué un afflux de phagocytes par injection d'eau salée dans le liquide péritonéal, il constate la présence de particules mercurielles dans quelques globules blancs de ce liquide.

Les phénomènes de fixation, d'englobement et de transformation dont nous venons de parler semblent être complétés par une intervention plus immédiate encore des phagocytes au cours du processus thérapeutique consécutif à l'injection de substances chimiques dans les tissus. Ainsi que le faisait remarquer Marcel Labbé (1) en 1903, « il est probable que les médicaments injectés sous la peau, dans le péritoine ou dans le sang, sont apportés par les leucocytes dans les régions du corps malades, irritées et traumatisées. C'est là une conséquence de la loi de Max Schüller sur les localisations morbides: ce ne sont pas seulement les microbes qui sont attirés par le point faible, mais aussi les principes utiles ». Schüller croit avoir démontré que le cinabre injecté dans la circulation est, chez les animaux malades, déposé dans les foyers morbides au lieu d'être, comme chez les animaux sains, apporté dans le foie et la moelle des os. « Ainsi, dit encore Marcel Labbé, grâce aux leucocytes, le médicament serait transporté dans l'organisme et irait, avec une électivité remarquable, apporter aux tissus malades l'énergie dont ils ont besoin pour lutter contre le processus pathologique. Le mercure serait apporté aux éléments éruptifs de la syphilis, le fer aux organes hématopoïé-

1. MARCEL LABBÉ. *Presse Médicale*, 1903, p. 725. Au cours du présent exposé, nous nous sommes inspirés, en partie, et avec le plus grand profit, des indications bibliographiques données dans cet article de M. Labbé.

tiques dans les anémies, le salicylate de soude aux articulations malades, etc. Mais il ne faut pas oublier que les médicaments paraissent avoir aussi une spécificité de localisation, et que telle substance introduite dans l'organisme se fixera sur tel organe défini. » Il est bien certain que l'on ne doit pas exagérer la part de l'électivité dans le transport des médicaments par les leucocytes vers les régions infectées. Cela conduirait, en effet, à reconnaître, chez ces cellules particulières, l'existence d'une sorte de pouvoir conscient qui, logiquement, ne saurait leur être attribué. Il est tout naturel, du reste, de supposer que l'élément curatif afflue dans les tissus lésés par le seul fait que les phagocytes, qui lui servent de support, y sont attirés en grand nombre à la suite d'un phénomène de chimiotaxie positive, remarquablement intense, provoqué par l'infection microbienne.

Après avoir passé en revue les données précédentes relatives à l'action des phagocytes sur les substances chimiques solubles ou insolubles introduites dans l'organisme, nous exposerons les faits observés à ce point de vue, en ce qui concerne le bismuth, et en particulier les résultats de nos propres recherches (1).

Les sels de bismuth solubles ou insolubles, employés dans le traitement de la syphilis sont injectés, les uns en solution aqueuse, les autres en suspension dans un liquide approprié (huile ou solution isotonique). Dans ce dernier cas, en particulier, on doit se demander quel est le mécanisme de la diffusion du médicament dans l'organisme, phase préliminaire de son action thérapeutique. A la lumière des données exposées précédemment, concernant la fixation des médicaments par les globules blancs, il semble naturel d'évoquer l'intervention de la phagocytose lorsqu'il s'agit d'expliquer la solubilisation du composé bismuthique et son transport jusqu'aux régions infectées par le tréponème. A ce sujet, les faits relatifs à l'action des phagocytes sur les composés mercuriels insolubles sont particulièrement suggestifs. Aussi bien, certains auteurs

(1) SAZERAC et VAURS. Mémoire préliminaire. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 91, p. 430, 1924.

ont-ils rapporté quelques observations concernant le rôle des globules blancs au cours de la résorption du bismuth dans l'économie.

Déjà, avant l'introduction de ce médicament dans le traitement de la syphilis, Zollinger (1), ayant maintenu à la température de 40-44° un mélange de pus et de sous-nitrate de bismuth, a constaté que les leucocytes, séparés après centrifugation, contenaient du bismuth.

A la suite d'une injection intramusculaire de tartro-bismuthate de K et de Na chez le lapin, Müller (2), examinant les tissus voisins de la région injectée, a pu voir que les veinules étaient entourées de leucocytes et de cellules plasmatiques. De plus, il a observé une inflammation aiguë des vaisseaux dans le tissu cellulaire sous-cutané. De ses observations, cet auteur conclut que les globules blancs doivent jouer un rôle notable au cours de la résorption du bismuth par l'organisme.

Nous avons eu l'occasion d'observer un cas remarquable d'englobement du bismuth par les leucocytes chez un chien qui avait reçu une injection de 0 gr. 200 de Bi précipité dans le muscle de la cuisse. Quelques jours après l'injection, la réaction leucocytaire était d'une grande intensité, à tel point que l'amas des globules blancs s'écoulait par l'orifice d'entrée de l'aiguille, sous la forme d'un liquide épais et noirâtre. L'examen au microscope montra que ce liquide renfermait un grand nombre de phagocytes chargés de bismuth et des particules encore libres du métal. On n'y rencontrait point de microbes de la suppuration. Il s'agissait donc d'un écoulement leucocytaire aseptique, dû à une mobilisation des phagocytes particulièrement active, provoquée par l'introduction du bismuth au sein des tissus (3).

Dans le but de reconnaître l'importance des phénomènes de phagocytose au cours de la mise en œuvre des propriétés spécifiques du bismuth, nous avons songé à examiner quelles peuvent être les réactions des cellules migratrices vis-à-vis des composés bismuthiques introduits dans la cavité péritonéale.

1. ZOLLINGER. *Beiträge für klin. Chirurg.* Tübingen, 27.

2. MÜLLER. *Münch. med. Woch.*, 1922, p. 547 et 4569.

3. Nous avons pu faire reproduire, par la photographie, le phénomène de phagocytose qui vient d'être décrit. Voir figure 1.

Dans ces conditions, en effet, l'observation du processus phagocytaire est singulièrement facilitée par suite de l'absence presque totale, au sein du liquide péritonéal, de cellules autres

FIG. 1.

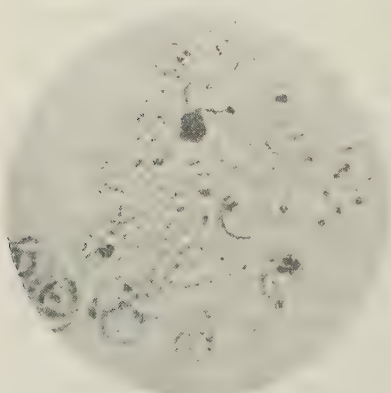


FIG. 2.

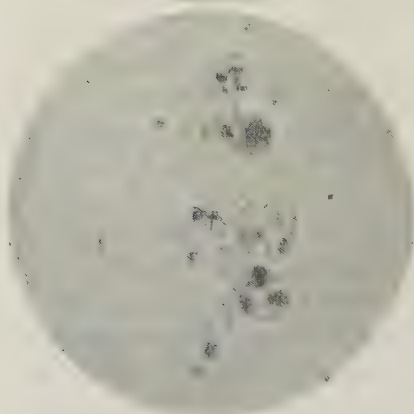
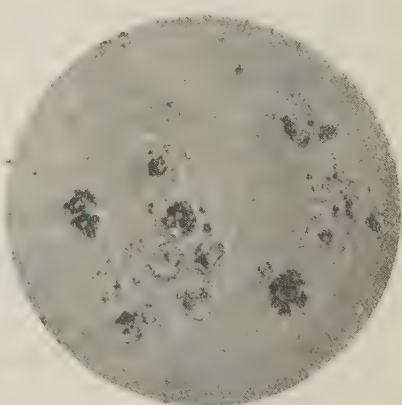


FIG. 3.

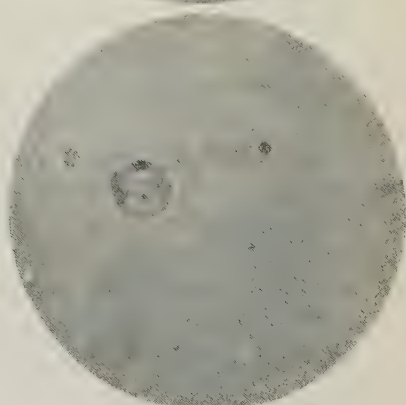


FIG. 4.

FIG. 1. — Englobement des particules de bismuth par les phagocytes, à la suite d'une injection dans le muscle de la cuisse, chez le chien.

FIG. 2. — Englobement des particules de bismuth par les phagocytes, vingt-quatre heures après une injection dans la cavité péritonéale du cobaye.

FIG. 3. — Même phénomène que figure 2. Après trois jours.

FIG. 4. — Même phénomène que figures 2 et 3. Après six jours.

que des phagocytes. Nous avons étudié d'abord, à ce point de vue, les effets produits par l'injection de bismuth précipité à

l'état de division extrême, dans le péritoine du cobaye, du rat et du lapin.

D'autre part, nous avons envisagé l'action curative de ces injections vis-à-vis des trypanosomiasés et des spirilloses dont les différents virus sont plus ou moins influencés par le bismuth (syphilis, spirochétose spontanée du lapin, spirilliose des poules, etc...). Dans le présent travail, nous rapporterons seulement les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne le *Trypanosoma Brucei* et le *Spirochæta cuniculi*.

OBSERVATIONS CONCERNANT LES PHÉNOMÈNES DE PHAGOCYTOSE.

Lorsqu'on injecte une suspension aqueuse de bismuth dans la cavité péritonéale du cobaye, on observe, quinze à trente minutes déjà après l'injection, un englobement actif des particules de métal par les phagocytes. Ce sont surtout les gros mononucléaires qui se montrent chargés de granulations noires, sur la nature desquelles il est impossible de se méprendre. En même temps, on note la présence de nombreux dépôts de granulations identiques dans la masse du liquide. Ces phénomènes sont faciles à reproduire par la photographie. Nous avons pu, grâce à la collaboration de M. Jeantet, obtenir quelques épreuves montrant l'incorporation des particules de Bi aux globules blancs (Voir fig. 2, 3 et 4).

La phagocytose augmente d'intensité avec le temps; le nombre des leucocytes s'accroît rapidement au point d'atteindre 150.000 et même 250.000 par millimètre cube, deux à trois jours après l'injection. En même temps, le liquide péritonéal se raréfie et devient crémeux. Puis le phénomène d'englobement du bismuth diminue d'intensité. Les granulations noires intraleucocytaires deviennent plus rares et sont surtout réparties sur la périphérie interne de la cellule. Il semble que l'on assiste à une transformation intraleucocytaire des particules de métal, qui aboutirait à la formation d'une substance soluble, probablement déversée, par la suite, dans le milieu externe. Au bout de huit à dix jours, à la dose de 0 gr. 050 par kilogramme, non toxique pour le cobaye, la phagocytose paraît terminée et le nombre des leucocytes redevient normal. Ces phénomènes semblent analogues à ceux qui ont été observés par Bes-

redka (1) en ce qui concerne le sulfure d'arsenic. Cependant, nous n'avons pas observé la phase préliminaire d'hypoleucocytose que Besredka avait notée après l'injection intrapéritonéale du composé arsenical et qui doit apparaître généralement, dans ces conditions, avec un corps toxique.

D'autre part, la formule leucocytaire du liquide péritonéal ne nous a pas semblé profondément modifiée, au point de vue des différentes sortes de phagocytes.

Voici maintenant le détail des observations au cours d'une expérience :

Un cobaye pesant 300 grammes reçoit, en injection péritonéale, 0 c.c. 5 d'une suspension aqueuse de bismuth à 2 p. 100, soit environ 0 gr. 033 de métal. Trente minutes après, prélèvement de liquide péritonéal. Un certain nombre de phagocytes renferment déjà des granulations de bismuth.

Au bout de deux heures, la phagocytose est active. Le nombre des phagocytes par millimètre cube est alors de 13.000.

Après douze heures, la phagocytose est tout à fait intense, et le liquide péritonéal renferme 55.000 globules blancs par millimètre cube.

Après vingt heures, le nombre s'élève à 134.000.

Après trente-six heures, on note 150.000 phagocytes.

Le liquide péritonéal devient épais et crémeux. La phagocytose est toujours active, et on note encore des dépôts de bismuth dans le liquide.

Après trois jours, le nombre des globules blancs par millimètre cube est de 200.000. L'englobement des particules de Bi est toujours actif.

Les quatrième et cinquième jours, le processus reste à peu près stationnaire.

Le sixième jour, le nombre des phagocytes renfermant du bismuth est moins considérable et les amas intraleucocytaires sont plus clairsemés.

Du septième au huitième jour, on observe la disparition graduelle du bismuth contenu dans les phagocytes.

Du huitième au dixième jour, la disparition est totale. La phagocytose prend fin, et le nombre des phagocytes redevient normal.

Nous avons répété maintes fois les injections de bismuth dans la cavité péritonéale du cobaye, et les résultats obtenus concordaient toujours entre eux.

Chez le rat, l'injection de bismuth dans la cavité péritonéale donne lieu à des observations très analogues à celles que nous avons faites pour le cobaye.

Nous devons noter que, dans ces conditions, le rat supporte une dose de bismuth atteignant facilement 0 gr. 200 par kilo-

(1) *Loco citato*, p. 3.

gramme d'animal, alors que le cobaye ne tolère pas une dose supérieure à 0 gr. 070 ou 0 gr. 080 par kilogramme.

Chez le lapin, nous avons également noté des résultats voisins de ceux que nous a donnés le cobaye; mais la période de phagocytose semble plus courte. Elle nous a paru terminée, en général, après cinq ou six jours.

La dose de bismuth supportée aisément par le lapin, en injections intrapéritonéales, est de 0 gr. 020 à 0 gr. 030 par kilogramme.

. .

Les données précédentes concernant l'absorption et la transformation probable du bismuth par les phagocytes du liquide péritonéal nous ont conduits tout naturellement, pour apprécier la portée des phénomènes observés, à essayer le traitement des spirochètoses et des trypanosomiasés par la voie des injections intrapéritonéales. Les résultats positifs qui pourraient être obtenus de cette manière conduiraient, en effet, à entrevoir plus nettement le rôle que doit jouer la phagocytose au cours de l'action du bismuth sur ces maladies. A en juger d'après l'intensité du processus phagocytaire, il semble probable que la totalité ou, tout au moins, la plus grande partie du métal injecté dans le péritoine passe à l'intérieur des cellules migratrices avant de pouvoir être transporté dans les différentes régions de l'organisme. Dès lors que l'on observera, dans ces conditions, un effet thérapeutique certain, on ne pourra manquer de conclure à l'importance de la phase phagocytaire dans le processus de guérison.

Nos premières expériences ont porté, à ce sujet, d'une part sur la trypanosomiasé du Nagana, et, d'autre part, sur la spirochètose spontanée du lapin.

ACTION DES INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES DE BISMUTH SUR LA TRYPANOSOMIASÉ DU NAGANA.

Nous avons d'abord choisi le rat comme sujet d'expérience parce que, chez cette espèce animale, l'infection par le *Trypanosoma brucei* est particulièrement aiguë, ce qui augmente la valeur des résultats obtenus.

Le virus dont nous nous sommes servi, et qui nous a été obligeamment fourni par M. Mesnil, tue infailliblement le rat en quatre à cinq jours.

Notons ici que l'action curative du bismuth vis-à-vis des trypanosomiasés est moins énergique que pour certaines spirochétoses (syphilis et spirochétose spontanée du lapin), ainsi qu'il résulte des recherches de Sazerac et Levaditi (1). Il n'a pas été possible, jusqu'à présent, de faire disparaître définitivement les trypanosomes du sang d'un animal, à l'aide des sels de bismuth, alors que les lésions produites expérimentalement avec le *Tréponème de la syphilis* ou le *Spirochæta cuniculi* sont guéries rapidement et d'une façon radicale par les injections de bismuth. Il convient donc d'insister sur ce fait que les guérisons enregistrées, après un traitement bismuthé, en ce qui concerne les trypanosomiasés animales, ne sont que temporaires.

Chez le rat, au troisième jour de l'infection, et alors que le sang renferme de nombreux trypanosomes, la dose de 0 gr. 200 de Bi par kilogramme, en injection péritonéale, fait disparaître les trypanosomes de la circulation périphérique dans le délai de vingt-quatre à quarante-huit heures. Une rechute se produit après une durée, assez variable, de quatre à dix jours suivant la gravité de la maladie, et les trypanosomes disparaissent de nouveau à la suite d'une nouvelle injection. En continuant à traiter ainsi l'animal, on peut obtenir une survie de quinze jours à un mois environ, par rapport aux témoins.

Voici, à ce sujet, la description détaillée d'une de nos expériences :

Six rats, pesant chacun 120 grammes environ, sont inoculés, le 17 mai, avec des quantités égales de sang renfermant de nombreux trypanosomes, prélevé sur un rat malade. Trois de ces animaux servent de témoins. Les trois autres sont traités par le bismuth, en injections intrapéritonéales, après l'apparition des trypanosomes dans le sang.

Les trois témoins meurent respectivement quatre jours, cinq jours et quatre jours après l'inoculation, alors que leur sang est peuplé de très nombreux trypanosomes.

En ce qui concerne les animaux traités par le bismuth, voici le relevé des observations :

Rat n° 1. — Le 19 mai : apparition des trypanosomes dans le sang. Injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth métal en suspension aqueuse.

(1) SAZERAC et LEVADITI, *C. R. Acad. des Sciences*, **172**, p. 1391.

Le 22 mai : disparition totale des parasites.

Le 26 mai : réapparition des trypanosomes dans le sang. Nouvelle injection intrapéritonéale de bismuth.

Le 2 juin : nouvelle réapparition des protozoaires. Injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth.

Le 4 juin : le sang ne renferme pas de trypanosomes.

Le 6 juin : nouvelle rechute. Nouvelle injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth.

Le 8 juin : 1 à 2 trypanosomes par champ.

Le 10 juin : l'animal meurt.

Survie de dix-neuf jours par rapport aux témoins.

Rat n° 2. — Le 19 mai : les trypanosomes apparaissent dans le sang. Injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth en suspension aqueuse.

Le 21 mai : le sang ne renferme plus de trypanosomes.

Le 30 mai : les trypanosomes apparaissent de nouveau dans le sang. Injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth.

Le 12 juin : l'animal meurt.

Survie de vingt et un jours par rapport aux témoins.

Rat n° 3. — Le 20 mai : le sang renferme de nombreux trypanosomes. Injection intrapéritonéale de 0 gr. 020 de bismuth en solution aqueuse.

Le 22 mai : disparition totale des parasites.

Le 24 mai : réapparition des trypanosomes dans le sang. Injection intrapéritonéale : 0 gr. 020 de bismuth.

Le 31 mai : Le sang ne renferme plus de parasites.

Le 2 juin : Nouvelle rechute, suivie d'une injection intrapéritonéale : 0 gr. 020 de bismuth.

Le 5 juin : nouvelle disparition des parasites.

Le 13 juin : le sang renferme des trypanosomes. Injection intrapéritonéale : 0 gr. 020 de bismuth.

Le 17 juin : disparition des parasites.

Le 21 juin : l'animal meurt. A cette date, son sang ne renferme pas de trypanosomes.

Survie de vingt-neuf jours par rapport aux témoins.

Après l'examen de ces observations, insistons encore sur ce fait que le traitement des trypanosomiases par le bismuth n'aboutit, en général, qu'à des guérisons passagères. Néanmoins, les résultats que nous venons d'enregistrer peuvent être considérés comme nettement démonstratifs en ce qui concerne l'action des injections intrapéritonéales de bismuth sur les trypanosomes.

En traitant comparativement, par voie intramusculaire, avec les mêmes doses de bismuth, les rats infectés par le même virus, nous avons obtenu des résultats très voisins des précédents.

On peut conclure de ces expériences comparatives que le bismuth introduit au sein du liquide péritonéal, ne renfermant

que des phagocytes comme éléments cellulaires, agit sur les trypanosomes aussi bien que lorsqu'il est injecté au sein des tissus où se rencontrent diverses espèces de cellules.

ACTION DES INJECTIONS INTRAPÉRITONÉALES DE BISMUTH
SUR LA SPIROCHÉTOSE SPONTANÉE DU LAPIN.

Nos essais concernant la spirochétose spontanée du lapin ont été effectués sur des animaux porteurs de lésions en pleine évolution et renfermant de nombreux spirochètes.

Dans ces conditions, à la dose de 0 gr. 020 à 0 gr. 030 par kilogramme, les injections intrapéritonéales de bismuth font disparaître les parasites en quarante-huit heures et guérissent complètement les lésions en cinq à six jours.

Nous donnons ci-dessous les protocoles de quelques observations.

PREMIÈRE OBSERVATION.

Lapin D/86. — Poids : 2.440 grammes. Porteur de lésions préputiales, renfermant de nombreux spirochètes. Le 25 mai, reçoit 0 gr. 030 de bismuth en injection intrapéritonéale. Le 27 mai, les spirochètes ont disparu. Le 28 mai, les lésions sont très améliorées et, le 1^{er} juin, elles sont complètement guéries.

Poids : 2.075 grammes. Pas de récidence.

DEUXIÈME OBSERVATION.

Lapin C/14. — Poids : 2.500 grammes. Porteur de lésions préputiales, renfermant de nombreux spirochètes.

Le 18 juin : Reçoit 0 gr. 020 de bismuth par kilogramme en injection intrapéritonéale.

Le 20 juin : Disparition des spirochètes.

Le 22 juin : Les lésions sont très améliorées, et, le 25 juin, leur cicatrisation est complète.

Poids : 2.450 grammes. Pas de récidence.

TROISIÈME OBSERVATION.

Lapin C/34. — Poids : 2.420 grammes. Porteur de lésions préputiales, renfermant de nombreux spirochètes.

Le 23 juin : Reçoit 0 gr. 025 de bismuth en injection intrapéritonéale.

Le 25 juin : Les spirochètes ont disparu.

Le 26 juin : Les lésions sont notablement améliorées.

Le 29 juin : Guérison complète des lésions.

Poids : 2.330 grammes. Pas de récidence.

Nous avons répété ces expériences à plusieurs reprises, dans les mêmes conditions; elles ont toujours donné lieu à des observations comparables à celles qui viennent d'être décrites.

D'autre part, nous avons exécuté des essais comparatifs en traitant des lapins atteints de spirochétose spontanée par des injections *intramusculaires* de bismuth, à des doses équivalentes à celles qui viennent d'être indiquées. Les résultats ainsi obtenus furent semblables à ceux que nous avons observés à la suite des injections intrapéritonéales.

Des constatations précédentes, il résulte que *le bismuth introduit dans la cavité péritonéale agit, sur le Spirochæta cuniculi, aussi efficacement que lorsque l'injection est pratiquée dans le muscle, c'est-à-dire dans un milieu complexe au point de vue histologique.*

*
* *

L'examen des observations que nous venons d'exposer montre que la phagocytose joue un rôle notable dans l'action des composés bismuthiques insolubles sur les spirochètes et les trypanosomiasés.

Jusqu'à quel point, maintenant, pouvons-nous préjuger de la portée exacte des phénomènes observés?

Deux interprétations particulièrement suggestives nous semblent à envisager dans le but d'expliquer l'action du bismuth introduit dans la cavité péritonéale.

D'une part, on peut supposer que le métal englobé par les phagocytes est peu à peu transformé en un produit soluble, doué d'un pouvoir trypanicide et spirillicide, qui passe dans le liquide péritonéal et, de là, dans la circulation générale, pour atteindre enfin les parasites, soit dans le sang, soit au niveau des lésions.

D'autre part, il est possible que les cellules chargées de bismuth émigrent de la cavité péritonéale et transportent l'élément spécifique jusque dans les régions envahies par le parasite. La transformation en produit actif s'effectuerait alors, partiellement tout au moins, en dehors du péritoine.

Nous avons essayé de vérifier cette seconde hypothèse en recherchant les globules blancs contenant du bismuth dans les

différents organes; mais, jusqu'à présent, nous n'avons pas réussi à l'y déceler. Nous poursuivons nos essais à ce sujet. Remarquons, du reste, que l'opinion générale des biologistes spécialisés dans l'étude de la phagocytose semble bien être que les cellules qui ont *phagocyté* énergiquement ne tardent pas à mourir sur place dans la région où elles sont entrées en action.

Sans doute, dans l'état actuel des recherches à ce sujet, il n'est guère possible de déterminer, d'une façon absolue, quelle est la part des phagocytes dans la transformation du bismuth en produit immédiatement nocif vis-à-vis des trypanosomes et des spirochètes. Néanmoins, les données déjà connues en ce qui concerne l'absorption et la transformation des médicaments par les globules blancs nous portent à croire que la phagocytose joue un rôle primordial au cours de l'élaboration par l'organisme d'un produit spécifique, aux dépens du bismuth injecté dans les tissus. Nos propres observations concernant l'englobement actif et la transformation probable du métal par les phagocytes du liquide péritonéal ne peuvent que confirmer, en partie tout au moins, cette manière de voir.

A ce point de vue, l'étude des réactions mutuelles qui peuvent intervenir entre les globules blancs et les *sels solubles* de bismuth semble pouvoir apporter quelques données utiles. C'est pourquoi nous poursuivons nos recherches en ce qui concerne la fixation du bismuth à l'état soluble par les leucocytes et l'intervention de ces cellules au cours de l'action thérapeutique exercée, dans les spirochètoses et les trypanosomiasés, par les produits bismuthiques en solution.

Le Gérant : G. MASSON.